



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜBERKÜLOZ TANISINDA KULLANILAN REAL-TİME VE IN-
HOUSE PCR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Halime DAĞGEZ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI**

MALATYA-2023



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜBERKÜLOZ TANISINDA KULLANILAN REAL-TİME VE IN-
HOUSE PCR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Dr. Halime DAĞGEZ
ORCID ID: 0000-0002-5545-3467**

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI**

MALATYA-2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	7
2.2.1. Dünyada Tüberküloz	7
2.2.2. Türkiye’de Tüberküloz	11
2.2.3. Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz Kontrol Önlemleri	14
2.3. Taksonomi.....	18
2.4. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	21
2.4.1. Mikobakteri Hücre Duvarı Yapısı	22
2.4.2. Genom Yapısı	23
2.5. Virülans, Patogenez ve Klinik.....	23
2.6. Tüberküloz Tanısı	28
2.6.1. Klinik Tanı.....	28
2.6.2. Radyolojik Tanı	32
2.6.3. Mikrobiyolojik Tanı	33
2.6.4. Moleküler Tanı Testleri	36
2.7. Tüberkülozda Tedavi	44
2.7.1. Koruyucu Tedavi (Tüberküloz Enfeksiyon Tedavisi).....	44
2.7.2. Tüberküloz Hastalığı Tedavisi	46
2.7.3. Çocuklarda Tedavi.....	47
2.7.4. Dirençli Hastalarda Tedavi.....	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
3.1. Dekontaminasyon Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemi.....	50
3.2. Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) Boyama ve Değerlendirme	51

3.3. Löwenstein- Jensen katı kültür yöntemi	51
3.4. Versa TREK/ESP Kültür Sistem II	52
3.5. GeneXpert MTB / RIF Ultra Real-Time PCR Yöntemi	52
3.6. DNA ekstraksiyonu	52
3.7. Artus® MTB-RG kiti ile PCR çalışması	53
3.8. In-House PCR Çalışılması	53
3.8.1. Mikobakteriler Spesifik Hsp65 Bölgesinin PCR İle Çoğaltılması	53
3.8.2. Jel Elektroforezi ve PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi	54
4. BULGULAR.....	56
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR	75
EKLER.....	88
EK.1. Etik Kurul Kararı	88

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemedi yol gösteren, sabırla teşvik ve destekte bulunan, bilgisiyle, nezaketiyle örnek aldığım başta değerli tez danışmanım Prof. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI ve eğitimimde önemli bilgi ve deneyim kazanmama katkı sağlayan Prof. Dr. Barış OTLU olmak üzere; eğitimim sırasında yetişmemde katkıları olan çok değerli hocalarım Prof. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL, Prof. Dr. Selma AY, Prof. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU ve Doç. Dr. Yücel DUMAN'a,

Hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen kıymetli ve fedakâr annem, babam ve kardeşlerime,

Bu süreçte desteklerini, sevgilerini her zaman hissettiğim, sabırla destek olan canım yavrularıma,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, hayatıma keyif katan değerli araştırma görevlisi meslektaşlarıma ve tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarının tüm çalışanlarına,

Sonsuz şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

Dr. Halime DAĞGEZ

Temmuz 2023/ Malatya

ÖZET

Tüberküloz Tanısında Kullanılan Real-Time ve in-House PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Amaç: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), TB tanısı için geliştirilen yeni PCR yöntemlerini test etmekte ve yüksek tanısal performans özelliği olanları onaylayarak rutin tanıda kullanımlarını önermektedir. Ancak, bu tür onaylı yöntemlerin pahalı oluşu onların kısıtlı kaynakları olan bölgelerde kullanımını azaltmaktadır. Bu çalışmada, klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* basil kompleksinin saptanmasında bir in-house PCR ve bir ticari real-time PCR kitinin etkinliğinin DSÖ tarafından önerilen TB-PCR kiti ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi TB Tanı Laboratuvarı'na 01 Ocak 2018-31 Aralık 2022 tarihleri arasında gönderilmiş örneklerden; klasik TB-tanı testleri yapılmış ve DSÖ tarafından önerilen Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, USA) kitleri ile TB-PCR testi gerçekleştirilerek sonuçları raporlanmış toplam 242 klinik örnek çalışmaya dahil edildi. In-house PCR yönteminde T11-T12 primerleri, ticari real-time PCR olarak Artus® *M.tuberculosis* RG-PCR kiti (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Bu iki PCR yönteminin tanısal performans değerleri DSÖ-onaylı PCR yöntemi ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışılan 242 örneğin 167'si TB-pozitif, 75'i TB-negatif idi. Örneklerin 165'i DSÖ-onaylı PCR ile pozitif ve geri kalan 77'si negatif olarak saptandı. T11-T12 in-house PCR'in, DSÖ-onaylı kit ile pozitif ve negatif örneklerdeki uyumu sırasıyla %78.72 ve %96.10 olarak saptandı. Artus real-time PCR'in DSÖ-onaylı kit ile pozitif ve negatif örneklerdeki uyumu sırasıyla %87.23 ve %98.70 olarak bulundu. Çalışmada, in-house PCR'in duyarlılığı %71.25, özgüllüğü %97.33; Artus real-time PCR'in duyarlılığı %74.25 ve özgüllüğü %99.40 olarak saptandı.

Tartışma: Elde edilen sonuçlar, çalışılan her iki alternatif PCR yönteminin negatif örnekleri saptamada DSÖ-onaylı PCR kiti ile %93 ve üzerinde bir uyum gösterdiğini; ancak, pozitifleri saptamada örnekteki basil yüküne bağlı olarak bu uyumun %57 ila %87 arasında değişebildiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* basil kompleks (MTBK), Artus *M. tuberculosis* RG, Xpert MTB/RIF Ultra, hsp65, T11-T12 DNA primeri, moleküler tanı

ABSTRACT

The Comparison of the In-House and Real-Time PCR Methods Used in the Diagnosis of Tuberculosis

Aim: The World Health Organization (WHO) tests new PCR methods developed for TB diagnosis, approves some of them those with high diagnostic performance and recommends their use in routine diagnosis. However, the high cost of such approved methods reduces their use in areas with limited resources. This study aimed to compare the effectiveness of an in-house PCR and a commercial real-time PCR kit in detecting *Mycobacterium tuberculosis* bacillus complex in clinical samples with of the TB-PCR kit recommended by WHO.

Materials and Methods: Among the samples sent to İnönü University Turgut Özal Medical Center TB Diagnostic Laboratory between 01 January 2018 and 31 December 2022; a total of 242 clinical samples, whose classical TB-diagnostic tests and TB-PCR tests were performed with Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, USA) kits recommended by WHO and whose results were reported, were included in the study. T11-T12 primers were used in the in-house PCR method, and Artus® *M.tuberculosis* RG-PCR kit (Qiagen, Germany) was used as commercial real-time PCR. The diagnostic performance values of these two PCR methods were compared with the WHO-approved PCR method.

Results: Of the 242 samples studied, 167 were TB-positive and 75 were TB-negative. 165 of the samples were detected as positive by WHO-approved PCR and the remaining 77 were negative. The concordance of T11-T12 in-house PCR with the WHO-approved kit in positive and negative samples was determined as 78.72% and 96.10%, respectively. The agreement between the Artus real-time PCR and the WHO-approved kit in positive and negative samples was found to be 87.23% and 98.70%, orderly. In the study, the sensitivity of in-house PCR was 71.25% and the specificity was 97.33%; The sensitivity of Artus real-time PCR was found to be 74.25% and the specificity was 99.40%.

Discussion: The results obtained showed that both alternative PCR methods studied showed 93% and above agreement with the WHO-approved PCR kit in detecting negative samples; however, it has shown that agreement in detecting positives can range from 57% to 87%, depending on the bacillary load in the sample.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* bacilli complex bacilli (MTBC), Artus *M. tuberculosis* RG, Xpert MTB/RIF Ultra, hsp65, T11-T12 DNA primers, molecular diagnosis.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ARB	: Aside Dirençli Bakteri
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
BCG	: Bacille Calmette-Guerin
CD4+TH	: Yardımcı T Lenfosit
COVID-19	: Koronavirüs
ÇİD-TB	: Çoklu İlaça Dirençli Tüberküloz
DGTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EMB (E)	: Etambutol
EZN	: Ehrlich Ziehl-Neelsen
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HSP	: Heat Shock Protein (Isı Şok Proteini)
IFN-γ	: İnterferon-gamma
INH (H)	: İzonyazid
İDT	: İlaç Duyarlılık Testi
İGST	: İnterferon Gama Salınım Testi
LAMP	: Loop Mediated Amplification (İlmik Aracılı Çoğaltma)
LJ	: Löwenstein Jensen
LTBE	: Latent Tüberküloz Enfeksiyonu
MTB	: Mycobacterium tuberculosis
MTBK	: Mycobacterium tuberculosis basil kompleks
NALC-NaOH	: N-Asetil-L-Sistein-Sodyum hidroksit
PAS	: Para Amino Salisilik asit
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Tepkimesi)

PZA	: Pirazinamid
RIF (R)	: Rifampisin
rRNA	: Ribozomal RNA
SM (S)	: Streptomisin
TB	: Tüberküloz
TBDT	: Tüberküloz Antijenine Dayalı Deri Testi
TBE	: Tris, Borik asit, EDTA x
TDM	: Tüberküloz Dışı Mikobakteri
TDT	: Tüberkülin Deri Testi
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- α
UV	: Ultraviyole
VSD	: Verem Savaşı Dispanseri
YİD-TB	: Yaygın İlaça Dirençli Tüberküloz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Seçilmiş mikobakteriler ile <i>Mycobacterium tuberculosis</i> basil kompleksinin (MTBK) üyeleri arasındaki evrimsel ilişki.....	7
Şekil 2.2. 2021 Yılı Tahmini TB İnsidans Oranları	8
Şekil 2.3. Yeni TB teşhis konan kişilerin vaka bildirimlerinde küresel durum, 2015–2021	9
Şekil 2.4. Yıllara göre tüberküloz hastaları; teşhis ve rapor edilen vaka sayılarının değişimsel grafiği ve 2019-2020-2021 sayısal değerleri.....	10
Şekil 2.5. Türkiye’de yılda bildirilen yeni veya nüks TB olan kişi sayısı, 2017- 2022	12
Şekil 2.6. VSD Birimlerinde Yapılan Tanı Çalışmalarının Yıllara Göre Değişimi, 2005-2019.....	13
Şekil 2.7. Yıllara Göre Tüberküloz İnsidansı (2005-2018)	14
Şekil 2.8. Türkiye’de tüberküloz hizmetleri yapılanması.....	17
Şekil 2.9. <i>Mycobacterium</i> cinsinin tüm genom filogenisi.....	20
Şekil 2.10. Mikobakterilerin Hücre Duvar Yapıları	22
Şekil 2.11. <i>M. tuberculosis</i> 'nin protein virülans faktörleri ve etkili oldukları immünolojik yapılar	25
Şekil 2.12. TB Enfeksiyonu ve Hastalık durumu	26
Şekil 2.13. ARB boyalı <i>M. Tuberculosis</i> basil ışık mikroskopi 1000 x büyütme görünümü.....	35
Şekil 2.14. Tüberküloz için başlangıç testleri olarak DSÖ tarafından önerilen hızlı teşhis test platformları (107), 2022.....	37
Şekil 4.1. Çalışmaya alınan numunelerin ait olduğu 202 hastanın yaş ve cinsiyet özelliklerine göre dağılımı	56
Şekil 4.2. Çalışmaya alınan 242 klinik numunenin örnek türüne göre sayısal dağılımları	57
Şekil 4.3. Çalışmaya alınan 242 örneğin GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile saptanmış pozitif ve negatif olma özelliğine göre numune tür dağılımları....	57
Şekil 4.4. 59-68 numaraları örneklere ait In-house PCR jel elektroforez görüntüleri....	58

Şekil 4.5. 1-51 numaralı örneklere ait Artus® MTB-PCR kiti ile PCR çalışma sonuçları	60
Şekil 4.6. 1-51 numaralı örneklere ait Artus® MTB-PCR kiti eğrileri	61



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. DSÖ End-TB hedef ve kilometre taşları	15
Tablo 2.2. Taksonomik sınıflandırma	18
Tablo 2.3. Runyon Sınıflaması	19
Tablo 2.4. Yaymaların Farklı Mikroskopi ve Boyama Türlerine Göre Sonuç Yorumları.....	35
Tablo 2.5. TB ve ilaç direnci tanısı için DSÖ tarafından önerilen yöntemlerin özeti....	38
Tablo 2.6. DSÖ tarafından onaylanan teknolojiler	39
Tablo 3.1. In-House PCR işleminde kullanılan maddelerin miktar ve konsantrasyonu	54
Tablo 3.2. Hsp65 gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu için reaksiyon şartları	54
Tablo 4.1. Çalışılan in-house ve real-time PCR yöntemlerinin GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti sonuçları ile uyumu. T11-T12 In-House PCR.....	59
Tablo 4.2. Çalışılan PCR testlerinin duyarlılık, özgüllük ve prediktif değerler gibi tanısal performans sonuçları	61
Tablo 4.3. Çalışılan PCR testlerinin pulmoner ve ekstra-pulmoner örneklerde GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR ile uyumu.	62

1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* basil kompleks (MTBK) başta olmak üzere bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan kronik seyirli bir enfeksiyondur. Başta akciğerler olmak üzere vücutta hemen hemen tüm organ ve dokuları tutabilen hastalık, önlenabilir ve tedavi edilebilir bir enfeksiyon olmasına rağmen günümüzde halen önemini koruyan bir halk sağlığı problemi durumundadır (1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre Koronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19) pandemisine kadar tek patojen kaynaklı global ölümlerin ilk sırasında yer alan TB ile global nüfusun 1/4'ü ile 1/3'ünün enfekte olduğu ve bu kişilerin %5-%10'unun hayatları boyunca en az bir kez aktif TB geçirdiği öngörülmektedir. Sadece 2021'de 1.6 milyon kişinin TB'a bağlı olarak hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir (2,3). Dünya Sağlık Örgütü, her yıl dünyada yaklaşık 3 milyon TB hastasının teşhis edilemediği ve dolayısı ile de tedavi alamadığını bildirmiş ve bu hastaları tespit etmek için stratejiler uygulamaya koymuştur. Tüberkülozun etkin kontrolündeki en önemli basamak; hastalığın hızlı ve etkin olarak tanısının yapılması, tedaviye hızla başlanması ve toplumda yayılımının azaltılmasıdır (2,3).

Tüberkülozun laboratuvar tanısında, aside-dirençli boyama (ARB) ile hazırlanmış boyalı mikroskopik inceleme, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) rutin olarak uygulanan yöntemlerdir. Bunlardan kültür, altın standart tanı yöntemi olup boyalı mikroskopik inceleme ile tüm hastalara rutin olarak uygulanmaktadır. Ancak, ARB boyalı mikroskopi yönteminin HIV+ hastalar, çocuklar ve akciğer dışı TB olgularındaki duyarlılığı düşük olup aynı zamanda basilin türü ve direnç profili hakkında veri sağlayamamaktadır (4,5,6). Kültür yönteminde ise sonuçların alınması haftalar sürebilmekte dolayısıyla tanı ve tedavi sürecinde gecikmeler yaşanmaktadır. Dolayısı ile hastalığın yaygınlığı artıp kontrolü zorlaşmaktadır. Tüm bu sınırlılıklardan dolayı, PCR gibi moleküler yöntemlerin birkaç saat içinde sonuçlanması ve örnekte az sayıda olsa bile basilin etkin olarak saptanması nedenleriyle TB tanısındaki önemi gittikçe artmaktadır (5,6,7). Bu amaçla birçok Real-Time ve İn-House TB-PCR yöntemi geliştirilmiş olup bunlardan bazı kitler aynı anda hem basili ve hem de ilaç direnç genlerini saptayabilmeleri nedeniyle yaygın bir klinik kullanıma kavuşmuş ve DSÖ tarafından klasik tanı algoritmasına eklenmiştir (8,9,10). Tüberkülozun daha çok gelişmemiş veya gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olarak sebat ediyor olması (ör.; dünyadaki TB hastalarının yarısı Bangladeş, Çin, Hindistan, Endonezya, Nijerya, Pakistan, Filipinler ve

Güney Afrika gibi ülkelerde bulunmaktadır) göz önüne alındığında bu tür etkili ancak pahalı ve yüksek teknoloji gerektiren moleküler yöntemlerden bu gibi ülkelerin istifade edebilmesini zorlaştırmaktadır.

Kullanıma giren hızlı TB-PCR tanı kitlerinin çalışılması için mutlaka kendi özel cihaz ve yazılımına gerek duyulmakta ve nitelikli, eğitilmiş laboratuvar çalışanlarına ihtiyaç olmaktadır. Bu durum, maliyet hususunu arttıran bir diğer özellik olmakla beraber aynı zamanda TB gibi önemli bir halk sağlığı sorununu üretici firmanın coğrafi satış politikaları ve servis-bakım yeterlilikleri içine hapsedmektedir. Yüksek maliyet sorunu, özellikle sınırlı kaynakları bulunan ülkelerin sağlık kurumlarında bu tür testlerin kullanımını zora sokmaktadır.

Diğer taraftan, son yıllardaki moleküler mikrobiyolojik tanı sistemlerinde hızlı gelişmelere bağlı olarak TB-PCR amacıyla üretilmiş bulunan kit ve sarf malzemelerinin kalitesi, tanı kapasitesi ve tanısal performans değerleri artırılarak bu piyasadaki rekabet yükselmiştir. Dolayısı ile etkin tanı kitlerine daha ucuz olarak ulaşım olanağı artmış; tek firma bağımlı olmayan ve özel cihaz-yazılım gerektirmeyen bu tür kitlere ulaşım kolaylaşmıştır. Ancak, böylesi tanı kitlerinin uzun yıllardır kullanımda olan ve DSÖ tarafından onaylanmış kitlere göre tanısal etkinliklerinin ne düzeyde olduğu hakkında bağımsız araştırmacılar tarafından üretilmiş veri oldukça kısıtlı kalmıştır.

Bu tezin amacı, ilimiz Tüberküloz Tanı Laboratuvarında işlenmiş ve usulüne uygun olarak stoklanmış pozitif ve negatif hasta örneklerinde bir ticari Real-Time TB-PCR kiti ile bir in-house TB-PCR yönteminin etkinliğinin saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tüberküloz, insanlık tarihinin en eski bir enfeksiyon hastalığı olup günümüze kadar toplumlarda önemli düzeyde mortalite ve morbiditeye neden olmuş ve sağlık sistemlerine ciddi bir ekonomik yüke sebep olmuştur. Tüberkülozun insanların hayatı üzerine daha birçok benzersiz etkileri olmuş; bir taraftan sosyal damgalama ve izolasyona yol açarken diğer taraftan şarkı, şiir ve nesir gibi edebi eserlerde kendine yer bulmuştur.

Dünya üzerinde bin yıllardır süregelen varlığı ve tüm coğrafi bölgelerdeki yaygınlığı nedeniyle tarih boyunca çeşitli isimlendirmelerle anılmıştır. Farklı kültürlerde oluşturduğu kliniğin yansımaları ile “Tüketim hastalığı” (Consumption), “Beyaz ölüm” (White death), “Beyaz veba” (White plague), “Ölümün Kaptanı (Captain of the Death), “Phytisis”, “meslul” gibi isimlerle anılmıştır. Ülkemizde “Teverrüm”, “zaafiyet”, “duman” olarak da adlandırılmışsa da hassas, romantik ve sanatçı kişiliğe sahip kişilerde daha sık görülmesi nedeniyle en sık “ince hastalık” olarak anılmıştır (11,12,13).

İnsanlığa ait kayıtlarda TB’a yapılan atıflar, MÖ 2700 Çin tıbbi metinlerine, MÖ 1500 Hindistan’ın Vedik yazılarına, MÖ 1300-400’deki Mısır eserlerine ve İncil ve Eski Ahit gibi dini kitaplara kadar uzanır. Hipokrat, Galen, Paracelsus gibi ünlü hekimlerin eserlerinde TB belirtilerinin tanımlandığı ve çeşitli tedavilerin önerildiği görülmektedir (12,14). Fosil kalıntıları, mumyaların doku ve kemiklerdeki pott apsesi de dahil olmak üzere TB granülomlarına bağlı oluşan yapısal değişiklikler; Eski Mısır, Kolomb öncesi Amerika ve Neolitik Avrupa’nın paleopatolojik çalışmalarda gösterilmiştir. Tüberkülozun arkeolojik araştırmaları en kapsamlı olarak eski Mısır mumyalarına uygulanmıştır. İlk ve en bilinen vaka bulguları, ~MÖ 1200’lü yıllarda 2. Ramses döneminde yaşamış bir rahibin mumyalaanmış kalıntılarındaki vertebra tüberkülozuna bağlı morfolojik değişikliklere dayanır. Yine MÖ 700 yılında on yaşında ölen Peru’lu çocuk Hacienda’nin mumyasında da tüberkülozdan kaynaklanan Pott apsesi kalıntıları bulunmuş ve *M. tuberculosis*’in ilk kez moleküler olarak PCR ile tanımlanması bu çocuktan alınan doku kullanılarak yapılmıştır (15).

Orta çağda tüberküloz Avrupada çok yayılmış olup Sanayi Devrimi’yle birlikte insanların kentlerde sağlıksız, fakir ve kalabalık koşullarda yaşamasının buna neden olduğu anlaşılmıştır. On sekizinci ve 19. Yüzyıllarda Avrupa nüfusunun yaklaşık %70’inin vereme yakalanmış olduğu bilinmektedir. Fabrikalarda çalışan genç, fakir, göçmen nüfusun birçoğunun bu nedenle ölmesi üzerine eşi de aynı hastalıktan ölen

edebiyatçı ve avukat DuBois "Verem, kapitalist toplumun insafsız emek sömürüsü nedeniyle ödemek zorunda olduğu kefarettir" diyerek TB ve insanlık tarihine geçecek önemli bir yorumda bulunmuştur. Diğer taraftan, İngiltere Kralı VI Edward, Fransız Kralı IX Charles, Moliere, Bronte, Anton Checov gibi birçok ünlü isim de veremden ölmüştür (11,16).

Orta çağın bilimsellikten uzak etkisi nedeniyle TB araştırmalarında deneysel yaklaşıma geçiş özellikle yavaş olmuştur. Dünyada farklı bölgelerde zaman içinde epidemilerle seyretmiş olan TB üzerinde en değerli çalışmalar, 1700'lerin sonunda yaşamış olan Rene Laenec ve Gaspard Laurent Bayle tarafından yapılmıştır. Bu iki araştırmacı hastalığın kliniği ve patolojisi hakkında o zamana kadar bilinenlere önemli katkı sağlamışlardır. Steteskobu bulan Laenec akciğer seslerinin daha net değerlendirilmesi ile TB bulgularında farkındalık sağlamıştır. Bayle ile patoloji ve otopsi çalışmaları yapan Laenec tüberkül çeşitlerini tanımlamış ve tedavi olasılığına dikkat çekerek "Recherches sur la phthisie pulmonaire (Akciğer tüberkülozu araştırması)" adlı eseri yayınlamıştır. Bayle tüberküllerin akciğer dışındaki organlarda da tespit edilebileceğini ve miliyer tüberkülozu tanımlamıştır (12,17,18).

Hastalığa Tüberküloz ismi verilmesi Johann Schönlein tarafından 1839'da olmuştur (19). On dokuzuncu yüzyılın başlarında TB'un etyopatogenezi çokça tartışılmış; bulaşarak yayıldığı, hereditör geçebileceği veya bir kanser türü olabileceği düşünülmüştür. Tüberkülozun bulaşıcı doğası, askeri tıp okulunda cerrah olan Jean-Antoine Villemin tarafından 1865'te; laboratuvar tavşanlarına, enfekte insan ve sığırlardan alınan materyalleri aşılması üzerine gösterilmiştir (18,19). "Tüberküloz Üzerine Çalışmalar" adlı eserinde bulgularını açıklamasına rağmen değeri anlaşılamayıp göz ardı edilmiştir. Tüm bu tartışmalar sürerken 1882'de, Robert Koch; genç yaşta ölen bir hastanın akciğerinden bakteriyi izole ederek hastalığın etkeninin yavaş büyüyen *Mycobacterium tuberculosis* olduğunu bildirmiştir. Bulgularını "Die Ätiologie der Tuberkulose" (Tüberkülozun Etiyolojisi) adıyla yayımlamış ve 24 Mart 1882'de Berlin'deki Alman Fizyoloji Derneği'nin huzurunda sunmuştur. Koch'un raporu 1884'te genişletilerek araştırmacının göstermiş olduğu bu basilin; Koch Postulatu olarak bilinen deneylerinin sonucunda, "Tüberküloz lezyonlarında bulunan basillerin tüberküloza sadece eşlik etmediği, aksine ona neden olduğu sonucuna varmamı sağlıyor. Bu basiller tüberkülozun gerçek ajanıdır." cümlesi ile açıklamıştır (19,20,21). Tüberkülozla ilgili çalışmalarına devam eden Koch, gliserol üzerinde basillerin büyümesinden sonraki süzüntüden elde edilen old tüberkülini tedavi amacıyla kullanmıştır. Sonrasında hastalarda

klirik tüberkülozun kötüleşmesi, advers reaksiyonların görülmesi ve hastalığın tedavi edilememesi ile sonuçlanmıştır. Bu keşfi takip eden yıllarda, Clemens von Pirquet ve Mantoux tüberkülin cilt testlerini 1907'de geliştirmiş ve 3 yıl sonra asemptomatik çocuklarda gizli TB enfeksiyonunu göstermek için kullanmışlardır (22). Florence Seibert, 1930'lerden bugüne kadar kullandığımız pürifiye protein türevini (PPD), Pensilvanya Üniversitenin Phipps Enstitüsünde geliştirmiştir. Fransız araştırmacılar olan Albert Calmette ve Camile Guérin, Nocard isimli doktorlar, inek memesinden ürettiği bovin tipi basili patates-gliserin-safralı vasatta 230 kez pasaj yaparak 1921 yılında ilk TB aşısı olan Bacillus-Calmette-Guérin'i (BCG) geliştirmişlerdir (11,12,21). İlk aşılama Paris'te akciğer tüberkülozu nedeniyle ölmekte olan bir anneden doğan ve veremli bir büyükannenin bakımına verilen bir bebeğe yapılmıştır. Başarılı uygulamadan sonraki yedi yılda Calmette'in çocukları da dahil olmak üzere yüz binden fazla çocuk aşılanmıştır. Ancak 1930'da Almanya'nın Lübeck kentinde aşılanan 249 çocuktan 73'ü tüberkülozdan ölmüştür ve tarihe bir dram olarak kayıtlara geçmiştir. Sonradan yapılan araştırmada, çocuk hastanesine gönderiler aşırı virülen basil karıştığı anlaşılmıştır (11,22).

Yıllar boyunca birçok araştırmacı ve hekim tüberkülozu anlamaya çalışırken tedavi çabaları da devam etmiştir. Çin, İran, Yunan tabletlerinde ve yazıtlarda mantık dışı maddelerin (hayvan pisliği, idrar, saç külü, domuz akciğeri...) TB tedavisinde kullanılmaya çalışıldığı görülmektedir. Bu durum, insanlığın bu hastalık karşısında ne kadar aciz kalmış olduğunun bir göstergesidir. Hipokrat; TB tedavisinde katran kullanmış, Galinos keçi sütü önermiş, Celcus ise bir insan öksürür ve balgam çıkarırsa bir inek almalı dağa çıkıp bu sütü içmeli demiştir. Orta çağ Avrupa'sında tedavi amacıyla hastalara müsil ilacı, lavman, fosforik asit, eter, karbonik asit, kalsiyum fosfat, afyon gibi maddeler; hatta taze insan kanı bile içirilmiştir, krallar insanların başına el sürerek onları tedavi etmeye çalışmışlardır (11,17,21).

On dokuzuncu yüzyılda TB tedavisi için temiz dağ havasının iyi geldiği fark edilip yüksek yerlere sanatoryumlar kurulmuştur. Avrupa'da ilk sanatoryum 1854 yılında Almanya'da Brehmer tarafından Slesia'daki Goebersdorf köyünde kurulmuştur (17). X ışınının 1895 yılında röntgende kullanılmasından sonra sanatoryumlar tanı, tedavi ve araştırma merkezleri haline gelmişlerdir. Çağlar boyunca birçok yöntemle tedavi edilmeye çalışılan tüberkülozda tüberkülatif pnömotoraksı da içeren cerrahi tedaviler de yapılmıştır (22,23).

Tüberkülozun modern tıptaki tedavi süreci 1943'te Jorgen Lehmann tarafından Para-amino salisilik asid (PAS) ile başlamıştır. Bakteriostatik bir ilaç olmasına karşın ilk

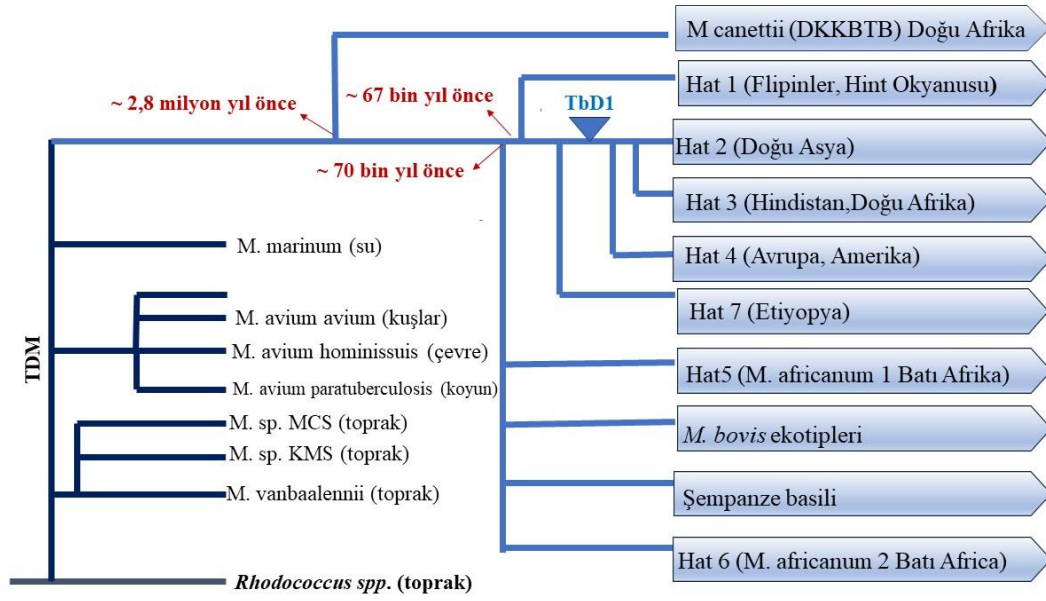
bulgular hayal kırıklığı oluşturmıştır. Ardından 1944'te Albert Schatz, Elizabeth Bugie ve Selman Waksman streptomycin'i tüberküloza etkin ilk bakterisidal ajan olarak duyurmuşlardır. Ancak bu ilaçların tekli tedavilerinde kısa sürede hastalığın tekrarlaması nedeniyle PAS ve streptomisin birlikte verilmeye başlanmıştır. Modern tedavi 1952'de isoniazid ve sikloserin, 1954'te pirazinamid, 1956'da etiyonamid, 1957'de rifamisin ve 1962'de etambutol eklenmesiyle şekillenmiştir. Bin dokuz yüz seksenli yılların başlarında isoniazid ve rifampisin birlikte verildiğinde tedavinin 9 aya indirilebileceği, PZA de eklendiğinde tedavinin 6 aya kadar kısalabileceği tespit edilmiştir (22-24). Günümüzde TB ile mücadelede DSÖ'nün öncü çalışmalarıyla bilinen ilaçlarla daha kısa ve etkin tedavi kürleri, yeni ilaç denemeleri ve aşı deneyleri hızla devam etmektedir.

Tüberkülozun Türk dünyasına etkileri bin yıllar öncesine dayanır. Yakın tarihe bakıldığında, Osmanlı İmparatorluğunda özellikle on dokuzuncu yüzyılda hüküm süren, birçok padişah, harem sakinleri ve sadrazamın tüberkülozdan öldüğü bilinmektedir. İkinci Mahmud, I. Abdülmecid'in eşi, Adile Sultan'ın kızı Hayriye Hanım Sultan tüberkülozdan vefat etmişlerdir. İstanbul nüfusu yirminci yüzyılda 1,2 milyon kadarken ölümlerin yaklaşık %16'sının TB'dan kaynaklandığı bilinmektedir (11,25). Osmanlı imparatorluğunda tüberkülozun tedavisiyle ilgili bilimsel çabalar Robert Koch'un verem basilini bulmasından hemen sonraki yıllarda II. Mahmut'la beraber artmıştır. Veremlilere özel hastane yaptırılmış, hastane ve cezaevlerinde önlemler alınması sağlanmış, tükürük hokkası verilmesi şart koşulmuştur. İstanbul'da balgamda boyama ile Koch basili 1885 yılında gösterilmiştir. İkinci Abdülhamid'in isteği ile Cemiyet-i Tıbbiye-i Şahane TB çalışmalarını artırmış ve topluluğun çıkardığı Gazette Médicale d'Orient'de TB'un bulaşıcı olduğu ve TB'den korunma yolları yayımlanmıştır (26).

Türkiye Cumhuriyeti'nin ilk verem hastanesi Heybeliada Sanatoryumu, 1924'te Çam Limanı'na bakan tepede inşa edilmiştir. Veremle savaşın kolektif ilk adımı 1918'de sonraları işgalci devletler tarafından kapatılacak olan Veremle Mücadele Osmanlı Cemiyeti kurularak atılmıştır. Dr. Behçet Uz önderliğinde 1923 yılında İzmir Veremle Savaş Derneği kurulmuş, takip eden yıllarda zamanla İstanbul, Denizli ve Ankara dernekleri açılmıştır. Tüm dernekler 1948'de "Türkiye Ulusal Verem Savaşı Dernekleri Federasyonu" çatısı altında toplanmıştır. Ankara'da Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nde 1948 yılında BCG aşısı üretilmeye başlanmıştır (12,26,27).

Moleküler yöntemlerin gelişmesi ile *M. tuberculosis*'in evrimsel tarihçesi hakkında da önemli veriler elde edilmiştir. Tüberküloz araştırmalarında antik DNA'nın PCR ile tespitinden sonra bakteri hücre duvarı biyobelirteçleri, moleküler tiplendirme,

hedefli zenginleştirme, shotgun sekanslama ve metagenomik analiz gibi paleomikrobiyolojik gelişmelerle, *M. tuberculosis* soylarını ve genotiplerinin tarihi değişimi tanımlamıştır. Yaşı bilinen kalıntılardan *M. tuberculosis* soylarının tanımlanması, evrimsel değişim hızına ilişkin varsayımlarda bulunmak ve soyların ortaya çıkış tarihinin doğrudan hesaplanmasını sağlamıştır. Böylece tarihi, evrimi ve insanlık tarihindeki birlikteliği hakkında birçok veri elde edilmiştir. **Şekil 2.1**'de MTBK üyeleri arasındaki evrimsel ilişki görülmektedir (28,29,14).



TDM: Tüberküloz dışı mikobakteri

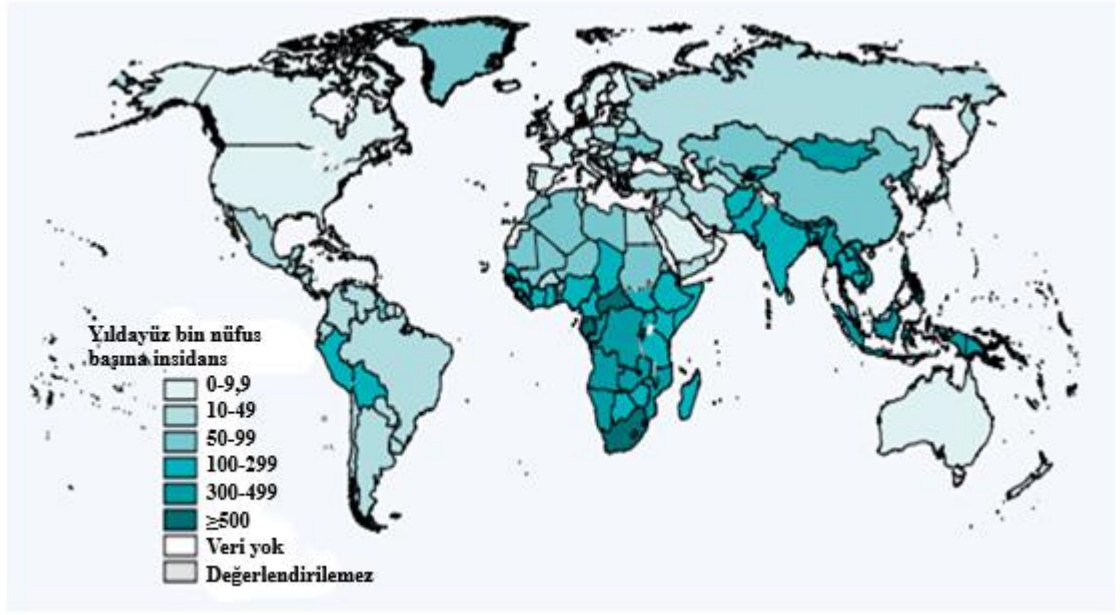
Şekil 2.1. Seçilmiş mikobakteriler ile *Mycobacterium tuberculosis* basil kompleksinin (MTBK) üyeleri arasındaki evrimsel ilişki (14).

2.2. Epidemiyoloji

2.2.1. Dünyada Tüberküloz

Dünya Sağlık Örgütü tarafından TB verileri zamanla geliştirilen çeşitli parametreler ve ülkeler tarafından bildirilen olgu sayılarını da kullanılarak tahmini olgu sayıları, insidans ve mortalite hızları hesaplanarak oluşturulmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2022 raporu, 215 ülke ve 6 bölgeye ait veriler içerir. Bu rapora göre, 2021 yılında 10,6 milyon kişinin TB hastası olduğu tahmin edilmektedir. Bunların 6 milyonu erkek, 3,4 milyonu kadın ve 1,2 milyonu çocuk hastalardır (1).

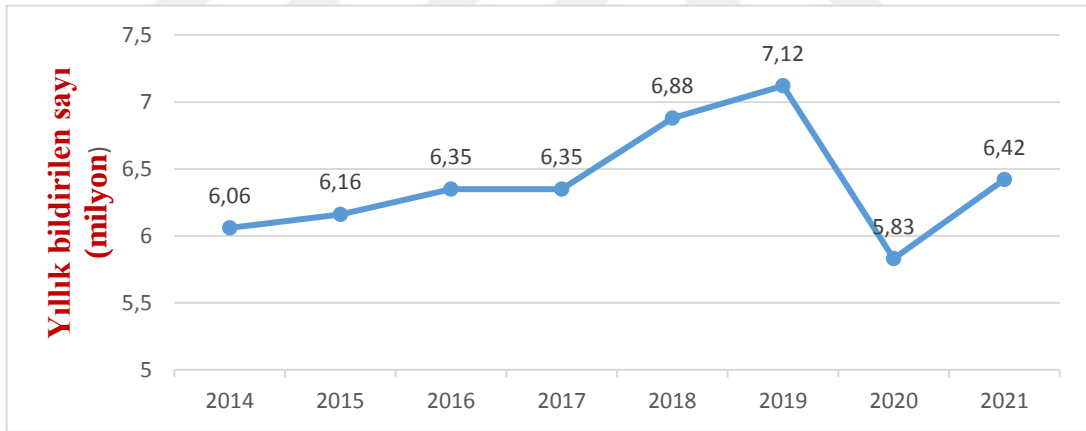
Tüberküloz insidansı dünya genelinde ülkeler arasında değişkenlik göstermektedir. 2021'de yüksek gelirli ülkelere ilişkin 47 ülkede; başlıca Amerika Kıtasında olmak üzere, Avrupa Bölgesi, Doğu Akdeniz ve Batı Pasifik bölgelerinde birkaç ülkede düşük TB insidansı (yüz bin nüfusta 10'dan az) görülmektedir. Yüksek TB yükü olan 30 ülkenin çoğunda yüz bin nüfusta 150-400 vaka ve Orta Afrika Cumhuriyeti, Gabon, Lesotho, Filipinler ve Güney Afrika'da 100.000 kişi başına 500'den fazla vaka görülmektedir. **Şekil 2.2**'de dünya geneli ülkelerde insidans oranları görülmektedir (1).



Şekil 2.2. 2021 Yılı Tahmini TB İnsidans Oranları (1)

Koronavirüs Hastalığı 2019 pandemisinin de etkisiyle 2019'a kıyasla 2020'de yeni TB teşhisi konulan ve resmi olarak bildirilen kişi sayısında belirgin bir küresel düşüş olmuştur. **Şekil 2.3**'te görüldüğü gibi 2019-2020 arasında 7,1 milyondan 5,8 milyona %18'lik bir düşüşü takiben 2021'de bu sayı 6,4 milyona çıkarak kısmi bir toparlanma olmuştur. En çok Hindistan, Çin, Endonezya ve Filipinler bu düşüşe sebep olmuştur (30,31,32). Tüberküloz hastalığına yakalanan tahmini insan sayısı ile yeni teşhis konulan ve bildirilen kişi sayısı arasındaki fark, 2019'a kıyasla hem 2020 hem de 2021'de artmış ve tahminen yıllık 4 milyonun üzerine çıkmıştır. **Şekil 2.4**'te bu farkın yıllar içindeki değişimi görülmektedir (1). Bu küresel uçurumun %75'inden Hindistan, Endonezya, Filipinler, Pakistan, Nijerya, Çin, Güney Afrika, Myanmar, Vietnam ve Demokratik Kongo Cumhuriyet sorumludur.

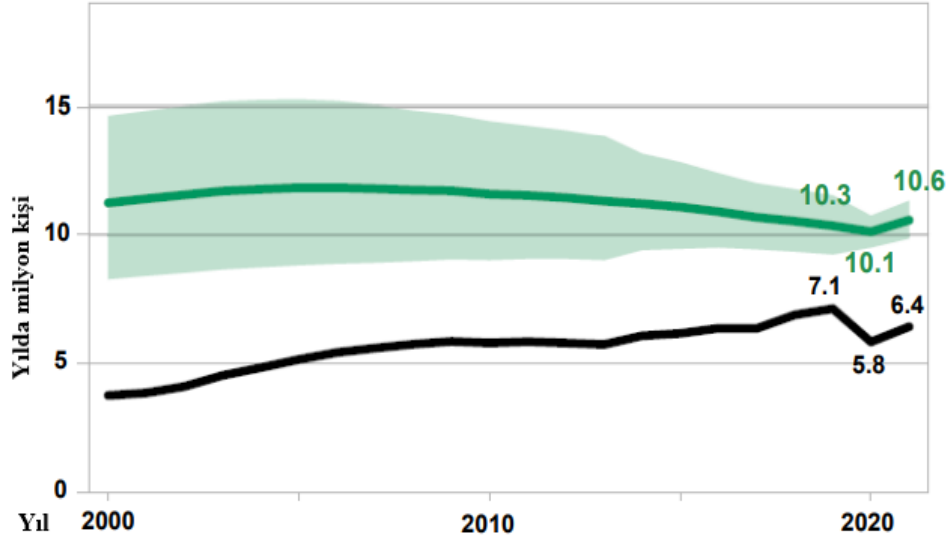
Tüberküloz vaka tespiti ve raporlamasında yaşanan sıkıntılar hem hasta hem de sağlık hizmetleri kaynaklı olmuştur. Pandemiye bağlı olarak sağlık sisteminin hizmet kapasitesinin azalması; sokağa çıkma yasağı ve beraberinde hareket kısıtlamaları nedeniyle tedavi aramanın azalması; COVID-19'a yakalanma ve damgalanma konusunda endişeler ve TB ile COVID-19 semptomlarındaki benzerliklere bağlı olarak bu durumun meydana gelmiş olduğu bildirilmektedir (30,31,33). Dünyanın birçok şehrinde yapılan pandemi dönemi çalışmalarda TB bildirim oranlarında belirgin düşüş mevcuttur. Çin'de 2020 Ocak-Mayıs arasındaki TB bildirimlerinin önceki yıl aynı döneme nazaran %36 oranında, Birleşik Krallık'taki 'Tuberculosis in England: 2021' raporu verilerine göre 2019-2020 yılları arasında bildirilen kişi sayısında %12,6, Güney Kore'de, yapılan çalışmada 2020'de vaka bildirimlerinin 2019'a göre %24 oranında ve ülkemizden yapılan çalışmada %21 oranında vaka tespit hızında düşüş olduğu saptanmıştır (33,34). Veriler pandemi nedeniyle son yıllarda TB tanısı konulan vaka sayılarındaki azalmalara bağlı tedavi edilmemiş TB sayısının arttığı, bunun da TB ölümlerinin artmasına ve enfeksiyonun toplumda daha fazla bulaşmasına neden olduğunu göstermektedir (1).



Şekil 2.3. Yeni TB teşhis konan kişilerin vaka bildirimlerinde küresel durum, 2015–2021 (32)

HIV pozitif tüberkülozlu 187 bin kişinin de içinde olduğu yaklaşık 1,6 milyon kişi 2021 yılında tüberkülozdan ölmüştür. İki bin yirmi yılına göre tüberkülozdan ölümler %4,5 artarak son yirmi yılda ilk defa tüberküloz sıklığı ve tüberküloza bağlı ölümlerde artış olmasına yol açmıştır. Hindistan, 2021'de küresel TB ölümlerinin %32'sinden tek başına sorumlu olmakla beraber; bu tür ölümlerin %82'si DSÖ Afrika ve Güneydoğu Asya bölgelerinde meydana gelmiştir. HIV negatif küresel TB ölümlerinin %54'ü

erkeklerde, %32'si kadınlarda ve %14'ü çocuklarda (<15 yaş) meydana gelmiştir (1,30,31).



*Yeşil grafik: tüberküloz hastalarının yıllara göre değişim grafiği

**Siyah grafik: Teşhis ve rapor edilen vaka sayılarının grafiği

Şekil 2.4. Yıllara göre tüberküloz hastaları; teşhis ve rapor edilen vaka sayılarının değişimsel grafiği ve 2019-2020-2021 sayısal değerleri (1)

Çoklu ilaca dirençli TB (MDR), bir halk sağlığı krizi ve global sağlık güvenliği tehdidi olmaya devam etmektedir. Bu tür suşların insidansı 2021 yılında 100 binde 5.7 olarak öngörülmüş, rifampisin (Rif)-dirençli MDR-TB (MDR-RR-TB) olan 450 bin hastanın tahmini oranı yeni vakalar arasında %3,6; daha önce tedavi edilenler arasında ise %18 olarak bildirilmiştir (31). İki bin yirmi birde ilaca dirençli TB hastası olan her üç kişiden sadece biri tedaviye erişebilmiştir ki bu sorunda COVID-19 pandemisinin önemli bir etkisi olmuştur (31).

Tüberkülozun etkin tanısı, ilaç direncinin saptanması ve zaman kaybetmeden tedaviye başlamak için DSÖ tarafından önerilen laboratuvar tanı yöntemlerinin tüm dünyada yaygın olarak kullanılması gerekmektedir. İki bin yirmi bir yılında dünya çapında akciğer TB teşhisi konan 5,3 milyon kişiden sadece %63'ü bakteriyolojik olarak doğrulanmış olup laboratuvar olanaklarının yaygınlığına göre bu tanı başarısı bölgelere göre %56-%79 arasında değişmektedir (1). Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen hızlı moleküler testlerden en az birinin dahi global olarak kullanım oranı halen düşük olup 2021'de yeni TB teşhisi konan 6,4 milyon kişinin yalnızca %38'inde (2,5 milyon) ilk tanı testi olarak bu yöntemlerden faydalanılmıştır. İki bin yirmi birde küresel düzlemde

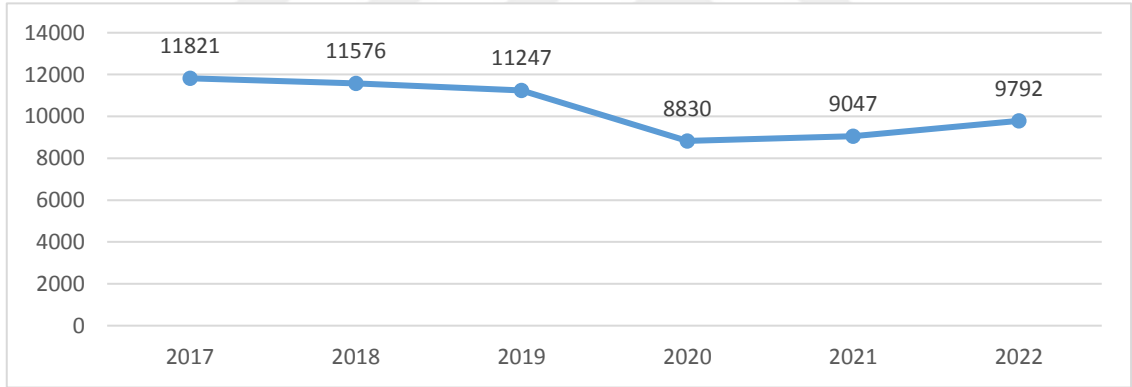
bakteriyolojik olarak doğrulanmış akciğer TB'li hastaların ancak %71'inde (2,4/3,4 milyon) rifampisin direnci test edilmiştir (35). Düşük olan bu oranların yükseltilmesi için DSÖ, TB tanısında araştırma ve inovasyonun önemine vurgu yapmakta ve ülkelere daha fazla fon sağlanması için çağrı yapmakta ve bu gibi çalışmalar için yılda ek 2 milyar ABD dolarına ihtiyaç duyulduğu tahmin edilmektedir. Düşük ve orta gelirli ülkelerde TB önleme, tanı ve tedavi hizmetlerine yapılan harcamalar, küresel olarak tahmin edilen ihtiyacın ve BM küresel hedefinin çok gerisinde kalmakta hatta son yıllarda bir düşüş trendi göstermektedir. Tüm dünyada bu rakam 2020-2021 yıllarında yalnızca toplam 5,4 milyar ABD doları olmuştur. Bu düzeydeki bir fon desteği, mevcut Küresel Plan (2018-2022 yılları arasındaki dönem için) ve 2020 ve 2021'de gerekli olacağı öngörülen miktarların; ayrıca, BM tarafından “Üst Düzey TB” konulu toplantıda belirlenen küresel hedefin yarısından daha azdır (1).

COVID-19 pandemisi küresel sağlık ve kalkınmadaki ilerlemeyi sekteye uğratmakla beraber End-TB strateji, BM Sürdürülebilir Kalkınma Hedef ve Dönüm Noktaları'na ulaşmada önemli olumsuzluklara sebep olmuştur. End TB'de TB'den ölümlerin mutlak sayısındaki azalma yüzdesi 2025 yılına kadar %75 hedeflenirken 2015-2021 yılları arasında bunun yalnızca %5,9'una ulaşmıştır. Tüberküloz insidansında azalma yüzdesi 2025 yılı için %50 olarak hedeflenirken 2015-2021 yılları arasında sadece %10 olarak hesaplanmıştır. Birleşmiş Milletler Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri'ndeki 2018-2022 yılları için 30 milyon kişiye önleyici verem tedavisi başlanması hedeflenirken 2018-2021 yılları arasında hedefin %42 si olan 12,5 milyon kişiye başlanabilmektedir. İki bin on sekiz-2022 için 40 milyon olarak hedeflenen tüm yaşlardaki tedavi sayısı değerinin ancak %66'sı olan 26,3 milyona ulaşılmıştır. Hedeflerdeki yetersiz ilerlemelerle beraber küresel olarak, yeni TB teşhisi konan ve ulusal hükümetlere bildirilen kişilerin sayısı 2019'da 7,1 milyondan 2021'de 6,4 milyona gerilemiştir. Global TB verilerinin hedeflenen değerlerden belirgin geride olması global stratejilerin uygulanmasına önem verilmesi, stratejilerin gözden geçirilerek eksikliklerin düzeltilmesi gerekliliğini bir kez daha göstermektedir (1,36).

2.2.2. Türkiye’de Tüberküloz

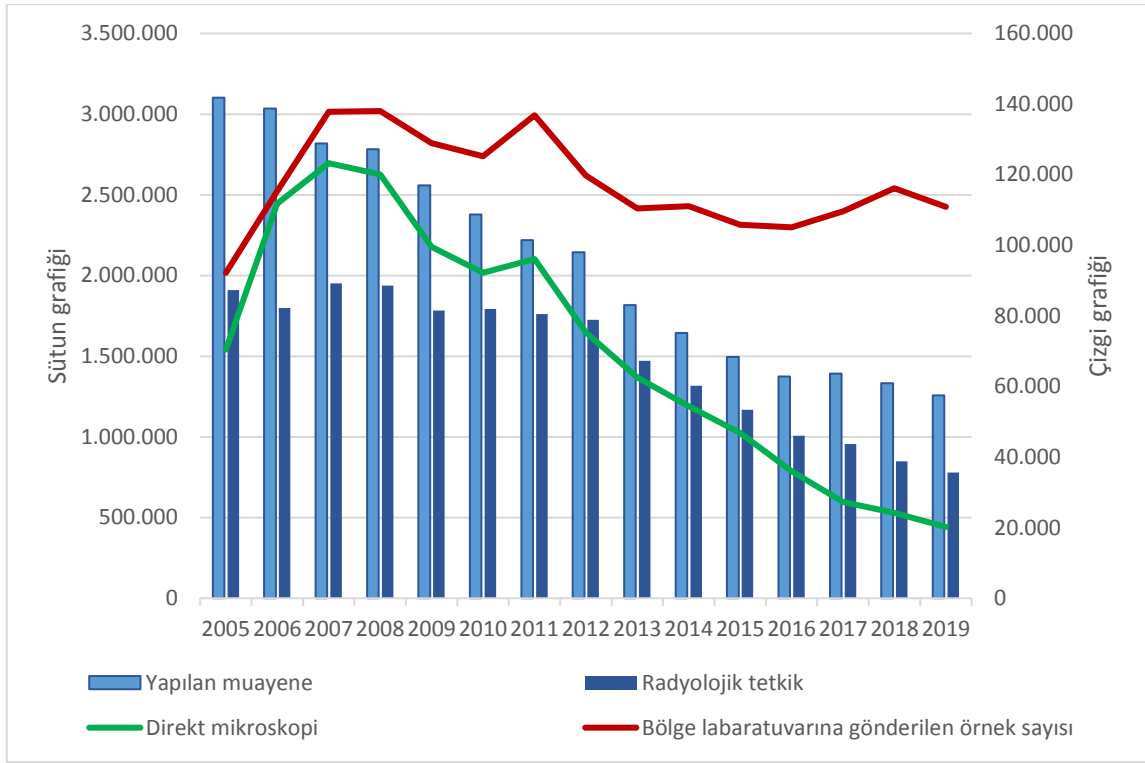
Dünya Sağlık Örgütü’nün Küresel Tüberküloz 2022 Raporunda, Türkiye’nin 2021 yılı tahmini insidansı yüz binde 18 ve TB ölüm oranı yüz binde 1,2’dir. Ayrıca Türkiye ÇİD-TB açısından yüksek hastalık yüküne sahip 30 ülke arasında değildir. Raporda Türkiye’de tahmini MDR/RR-TB insidansı yüz binde 0,5’tir. Rifampisin-dirençli MDR-

TB ile TB vakalarının tahmini oranı önceden tedavi görmüş olgularda %8 iken yeni olgularda %2,4 olarak verilmiştir. Türkiye’de bildirilen toplam vaka sayısı 2021 yılında 9047 olup 2020 yılına göre artmıştır. **Şekil 2.5**’te Türkiye’de 2017-2022 arasında yıllık bildirilen yeni veya nüks TB olan hasta sayıları görülmektedir (37). İki bin yirmi bir yılında bildirilen 9047 vakanın %78’i bakteriyolojik olarak doğrulanmış, %3,5’i teşhis anında hızlı tanı araçları ile test edilmiştir. Rifampisin direnci için test edilen bakteriyolojik olarak doğrulanmış TB vakalarının yüzdesi yeni vakalarda %88 iken tedavi edilmiş vakalarda %79’dur. İki bin yirmi bir yılında 129 hasta ilaç dirençli TB tanısı almıştır. Ekstrapulmoner TB oranı %27 olarak verilmiş; hastaların %80’inin HIV durumu biliniyor olarak tespit edilmiş ve bu toplam 80 (%1,2) HIV (+) TB hastası olduğu bildirilmiştir. Türkiye’nin 2020 yılında kaydedilen olgularda tedavi başarısı %81 ve nüks hariç daha önce tedavi edilmiş olgularda %47’dir. İki bin on dokuzda ikinci basamak tedaviye başlayan MDR/RR-TB vakalarında tedavi başarı oranı ise 46%’dir. Bakteriyolojik olarak doğrulanmış TB vakalarının ev temaslı olan çocukların (<5 yaş) tamamında koruma tedavisi başlanmıştır (38,39).



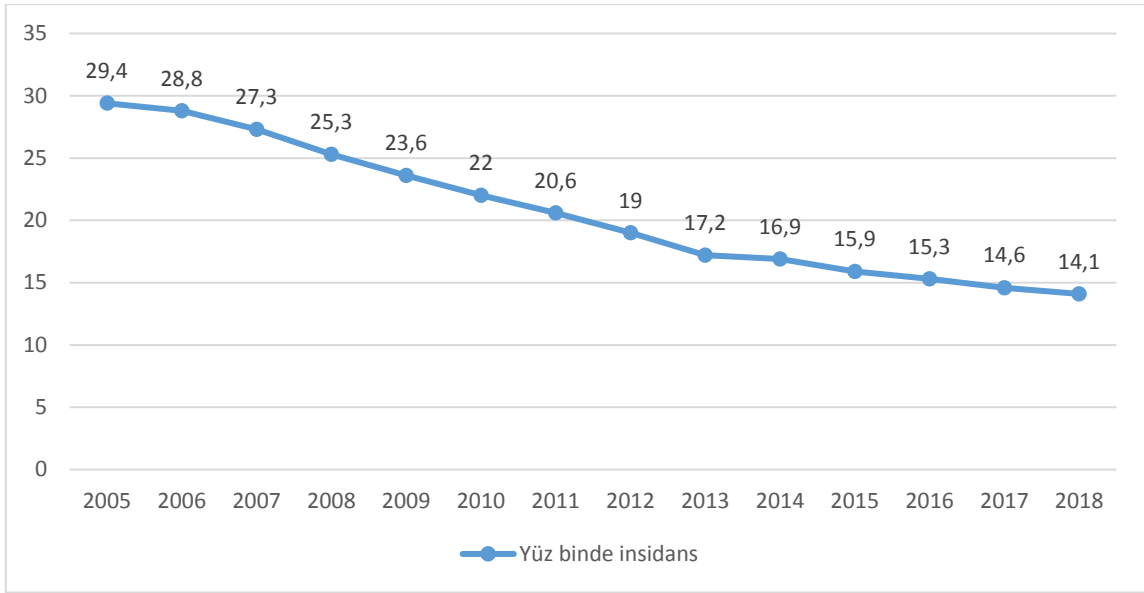
Şekil 2.5. Türkiye’de yılda bildirilen yeni veya nüks TB olan kişi sayısı, 2017- 2022 (37)

Türkiye’de verem savaş raporu 2020’ye göre 2019 yılı içerisinde 1.114 kurumda 266.794 kişinin röntgen taraması yapılmış, saptanan 7.359 şüpheli TB vakası ileri tetkike alınarak 104’üne TB tanısı konulmuştur. Verem savaş dispanseri birimlerinde yapılan tanı çalışmalarının kısa özeti **Şekil 2.6**’da görülmektedir. Sadece 2018 yılında 130.255 temaslı muayenesi (hasta başına 11,1 kişi) yapılarak 36.960 kişiye (hasta başına 3,1 kişi) koruyucu tedavi başlanmıştır. İki bin on dokuz yılında dispanserlerde kayıt altına alınan hastaların %98,5’inin tedavilerinde DGT uygulanmıştır (40,41).



Şekil 2.6. VSD Birimlerinde Yapılan Tanı Çalışmalarının Yıllara Göre Değişimi, 2005-2019 (41)

İki bin on sekiz yılında toplam 11.786 TB hastası verem savaş dispanseri (VSD) kayıtlarına girmiş ve TB insidansı 14,6'dan yüz binde 14,1'e gerilemiştir. Türkiye'de TB insidans hızı 2005 yılında yüz binde 29,4'dan yıllar içinde giderek azalarak 2017 yılında yüz binde 14,1'e gerilemiştir. **Şekil 2.7'**de Türkiye'de yıllara göre TB insidans hızındaki değişiklikler izlenmektedir (40,41). İki bin on sekiz yılında tespit edilen hastaların %57,5 erkek ve %42,5 kadından oluşmaktadır. Olgu hızı 65 ve üzeri yaş grubunda en yüksek düzeyde (yüz binde 30,7) olmakla beraber cinsiyet açısından bakıldığında erkeklerde yüz binde 16,5 ve kadınlarda 12,3'tür. İki bin on sekiz yılındaki toplam kayıtlı hastaların 1278'i yabancı ülke doğumlu olup sıklık sırasıyla %85,3'ü Asya, %7,5'i Avrupa, %7,0'si Afrika ve %0,2'si Amerika kıtası doğumludur. Hastaların %60,4'ü akciğer tutulumu, %5,3'ü hem akciğer hem de ekstrapulmoner tutulum göstermiştir. Akciğer dışı en sık %28,8 oranında ekstratorasik lenf bezlerinde tutulum tespit edilmiş olup plevra ve intratorasik lenf bezleri bunu takip etmektedir (40,41).



*İnsidans: $\text{Yeni+Nüks Olgu Sayısı} / \text{Nüfus} \times 100.000$

Şekil 2.7. Yıllara Göre Tüberküloz İnsidansı (2005-2018) (40,41)

İki bin on sekiz yılında akciğer TB tanısı alan 7.738 hastanın %90,5'ine yayma mikroskopisi (%57,8'i pozitif), %86,8'ine kültür (%80'i pozitif) yapılmıştır. Kültür testi pozitif olarak sonuçlanan hastaların yüzde 95,8'ine İDT yapılmıştır ve bu hastalarda toplam direnç oranı %19,2 olup ÇİD-TB oranı yeni olgularda %2,6, önceden tedavi görmüş olgularda %9,9 'dur (41).

İki bin on yedi yılında VSD'lere kayıtlı 11979 TB hastasında kadınlarda biraz daha fazla olarak %84,6 (yeni olgularda %85,7, önceden tedavi görmüş olgularda %71,1 oranında başarılı olarak tespit edilmiştir. Tüm olgularda ölüm oranı ise %7,0 olarak saptanmıştır (32,40,41,42,43).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre Türkiye'de End-TB strateji hedeflerinden olan TB ölümlerinde 2020'ye kadar %35 azalma olması iken 2015-2021 arasında %87'lik artış söz konusudur. İkinci bir hedef olan TB insidansında 2020 yılına kadar %20 azalma olması istenirken 2015-2021 arasında %3,8'lik gerileme mevcuttur (44).

2.2.3. Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz Kontrol Önlemleri

Tüberküloz yoksul ve gelişmekte olan ülkelerin bir sorunu gibi görünse de dünya genelinde enfeksiyona bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Yüz yıllar boyunca insan nüfusunun artması ile TB insidansı artış göstermiş ve 20. yüzyılın başlarına kadar bu artış trendi devam etmiştir. Antibiyotiklerin keşfi ile insanlık TB yayılımına karşı ilk kez etkili bir başarı sağlamış ve hastalık global olarak

kontrol altına alınmaya başlanmıştır. Ayrıca, hastalığın gelişim dinamikleri hakkındaki bilginin artması, uygun önleyici uygulamalar yaygınlaşması ve insanların yaşam ve refah düzeylerinin iyileşmesi hastalığın insidansının azaltılmasına önemli katkı sağlamıştır. Diğer taraftan, yıllar içinde birçok epidemiyolojik ve sosyal olaylar TB'un yaygınlığı artırıcı yönde yeni baskılar oluşturmuştur. Dünya Sağlık Örgütü bunları, HIV epidemisi, tedaviye dirençli türlerin yayılması, göçler, savaşlar, ekonomik yetersizlikler, TB kontrol programlarındaki aksaklıklar ve son olarak da COVID-19 salgını gibi nedenler olarak sıralamaktadır (36).

Dünya Sağlık Örgütü, 1993 yılında ilk kez bir hastalık için acil durum ilan etmiş ve TB için doğrudan gözetimli tedavi stratejisini yayımlanmıştır (45,46). Akabinde 2006-2015 yılları arasında Stop TB stratejisi geliştirmiş ve küresel tehdidin devam etmesi nedeniyle bu stratejiyi güncelleyerek 2014 yılında End-TB programını geliştirmiştir. Mayıs 2014'te DSÖ'ye üye olan tüm ülkeler bu strateji ve ilişkili hedefleri, dönüm noktalarını, destek ve ilkelerini benimsemiş ve bu hususların ülke düzeyinde uyarlanması gerektiği ilkesini kabul etmişlerdir. Bu stratejiler hasta merkezli bakım ve koruma, cesur politika ve destek sistemleri, araştırmaların yoğunlaştırılması ve yenilik bileşenlerinden oluşur. Ayrıca TB insidansı, TB'ye bağlı ölüm ve TB hastaları ile ailelerinin karşı karşıya kaldığı yıkıcı maliyetleri sıfırlama planlarını içeren 2015 ile 2035 yılları arasındaki değişimlerin takip edildiği küresel kilometre taşları ve hedefleri içermektedir. **Tablo 1**'de End-TB stratejilerinin dönüm noktaları ve hedefleri gösterilmiştir. Bu hedef düzeyleri ile beraber End-TB'nin uygulanmasını küresel ve ulusal düzeyde izlemek için yeni ve nüks TB hastalarının yüzdesi, latent TB enfeksiyonu tedavisi kapsamı, temaslı inceleme kapsamı gibi 10 göstergede belirlenmiştir (47,48).

Tablo 2.1. DSÖ End-TB hedef ve kilometre taşları (47)

Parametreler (2015 yılındaki değere göre hesaplanan)	Kilometre Taşları		Hedefler	
	2020	2025	2030	2035
Tüberküloz ölümlerinin mutlak sayısındaki azalma yüzdesi	35	75	90	95
Tüberküloz insidans hızındaki azalma yüzdesi (yılda yüzbin nüfus başına yeni vaka)	20	50	80	90
Tüberkülozdan etkilenen hanelerin katastrofik maliyetlerle karşılaşma yüzdesi	0	0	0	0

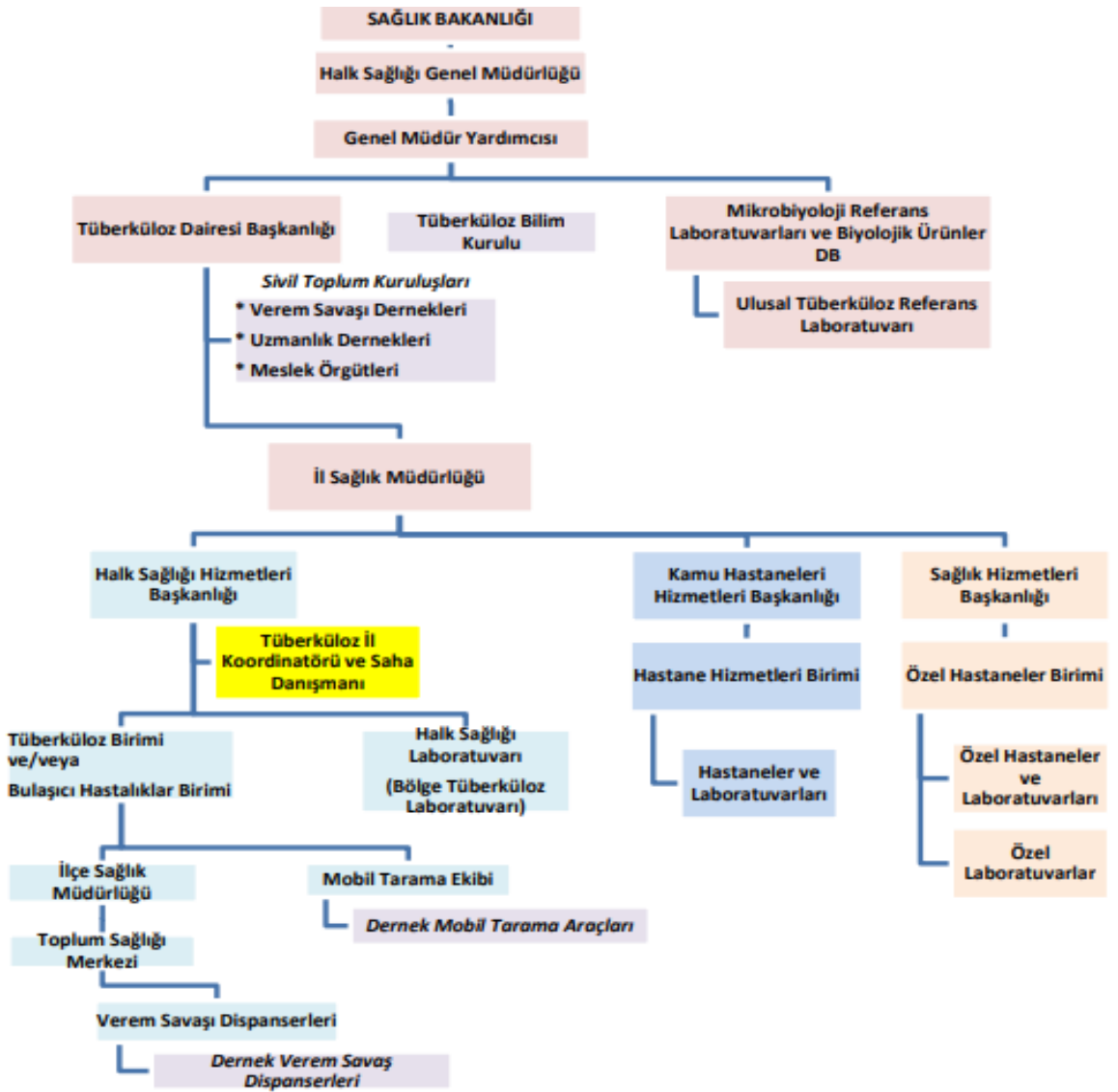
İki bin on beş yılı Eylül ayında Birleşmiş Milletler (BM) üye devletleri “Sürdürülebilir Kalkınma Hedeflerini” (SKH) benimsemişlerdir. Bu hedefler arasında doğrudan veya dolaylı olarak tüberküloz yükünü azaltmaya yönelik hedefler önemli yer tutar. "Herkes İçin Her Yaşta Sağlıklı Yaşam Sağlamak ve Genel İyi Halini Desteklemek" başlıklı üçüncü hedefinin bileşenlerinden biri 2030 yılına kadar TB epidemisinin bitirilmesi hedefine yöneliktir (36,49). Dünya Sağlık Örgütü, 2017'de düzenlenen Küresel Bakanlar Konferansı'nda TB'a son verilmesine ilişkin Moskova Deklarasyonu'nu yayınlarak ortaklara End-TB stratejisinin uygulanmasını hızlandırmak için çağrıda bulunmuş ve bu amaca uygun taahhütler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları; SKH yanıtını ilerletmek, yeterli ve sürdürülebilir finansman sağlamak, bilim, araştırma ve yenilik arayışı ve çok sektörlü sorumluluk çerçevesi geliştirmektir. İki bin on sekizde BM Genel Kurulu, TB konulu ilk üst düzey toplantısında taahhütleri yeniden teyit edilmiş ve küresel hedefe yönelik yeni taahhütler eklenmiştir. Ağustos 2020'de Dünya Sağlık Asamblesi tarafından “TB Araştırma ve İnovasyon için Küresel Strateji” kabul edilmiştir (36,47).

Dünya Sağlık Örgütü, 1990'ların ortalarından bu yana TB vakalarının ve sonuçlarının rutin kayıt ve raporlanmasına ilişkin standart bir yaklaşım sağlamış ve tüm üye devletlerle bölgeler bu standartlara göre DSÖ'ye ulusal veri bildiriminde bulunmaktadırlar. Örgütün küresel rehberliği, TB'la ilgili ulusal araştırmalara da standart bir yaklaşım sağlamıştır. Ayrıca DSÖ 1997'den beri TB salgınının küresel, bölgesel ve ülke genelindeki durumu ve teşhis ve tedavisinde kaydedilen ilerlemeleri de içeren verileri yıllık “Global TB Raporu'nda” yayımlamaktadır (31).

Tüberkülozun önlenmesinde ve durdurulmasına yönelik politikaların belirlenmesi, geliştirilmesi ve takibinde, ulusal ve global verilerin önemi büyüktür. Ülkemizde veremle mücadelede modern çabalar 19. Yüzyılın sonlarında başlamıştır. “Umumi Hıfzıssıhha Kanunu” 1930 yılında çıkarılarak verem bildirimi zorunlu hale getirilmiştir. Sonraki yıllarda kanunlardaki yeniliklerle Sağlık Bakanlığına bağlı Verem Savaş Daire Başkanlığı oluşturulmuştur. İki bin on bir ve 2017 yıllarındaki kanun hükmündeki kararnamelerle Sağlık Bakanlığı ve bağlı kuruluşların teşkilat yapısında değişikliğe gidilmesi sonucunda son olarak Tüberküloz Dairesi Başkanlığı, çalışmalarını Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'ne bağlı olarak yerine getirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün “Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi” (DGTS), ülkemizde 2006 yılında uygulanmaya girmiş ve bu kapsamda dispanserlere kayıtlı hastaların verileri bireysel olarak toplanıp raporlanmaya başlanmıştır. Tüberküloz ile mücadele, yenilikçi politikalar ışığında

uluslararası kurum ve kuruluşlarla birlikte alınan ulusallaştırılmış kararlarla yürütülerek gelişmeye devam etmiştir. Ülkemizde “Veremsiz Bir Türkiye” hedefine ulaşmak için Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı (UTKP) uygulanmaktadır. Tüberküloz kontrolünde Halk Sağlığı Genel Müdürlüğüne bağlı Tüberküloz Dairesi Başkanlığı merkezi birimdir ve **Şekil 2.8**’de ülkemizdeki TB hizmetleri yapı şeması görülmektedir (9,50,51).

Ülkemizde TB tanı ve tedavisi VSD’de ücretsiz olarak yapılmaktadır. TB hastalarının yıkıcı maliyetlerden korumak amacıyla Aile ve Sosyal Hizmetler Bakanlığı tarafından nakdi yardım yapılmaktadır (47,50).



Şekil 2.8. Türkiye’de tüberküloz hizmetleri yapılanması (50).

2.3. Taksonomi

Mikobakteri cinsi, ilk olarak 1896'da Lehmann ve Neumann tarafından, esas olarak *Mycobacterium tuberculosis* tipi suşun özelliklerine dayanarak adlandırılmış (52). Prokaryot aleminin, Actinomycetota şubesinin, Actinomycetes sınıfının, Mycobacteriales takımının, Mycobacteriaceae ailesinde yer alır ve içerisinde 250'den fazla tür barındırır (53,54). **Tablo 2.2'**de taksonomik sınıflaması görülmektedir.

Tablo 2.2. Taksonomik sınıflandırma (53)

Alem Bacteria 90
Şube Actinomycetota 10
Sınıf Actinomycetes 21
Takım Mycobacteriales 8
Aile Mycobacteriaceae 8
Cins Mycobacterium 266

Mikobakteriler, insan ve hayvanlarda patojenik potansiyellere sahip besiyerinde farklı üreme hızı, koloni morfolojisi ve pigment özellikleri gibi çeşitli üreme dinamiklerine sahip bakteri grubudur (55). Mikobakteriler diğer bakterilerle karşılaştırıldığında yavaş çoğalırlar. Üreme paternlerine göre başlıca yavaş ve hızlı üreyenler olarak sınıflandırılırlar. Hızlı üreyenlerde gözle görülür büyüme için en az beş günlük inkübasyon gerekirken yavaş üreyenlerde daha uzun süre (haftalar) gerekir (52). Mikobakteri cinsi içindeki türler arası ilişkiler öncelikle 16S rRNA gen dizileri analizi ve fenotipik özelliklerine dayandırılmış sonrasında 16S-23S ara dizileri ve çeşitli referans genler kullanılarak araştırılmalar genişletilmiştir. İlk olarak 1950'de **Tablo 2.3'**te görülen Runyon tarafından *M. tuberculosis* ve *M. bovis* dışındaki mikobakteriler katı besiyerindeki üreme hızı, koloni morfolojileri ve pigment özelliklerine göre 4 grupta sınıflandırılmıştır (56).

Tablo 2.3. Runyon Sınıflaması (56)

Grup adı	Üreme hızı	Pigment üretimi	Koloni morfolojisi	Üyeler
I	Yavaş	Karanlıkta renksiz, ışıktta pigmentli (Fotokromojenler)	R	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>
II	Yavaş	Karanlıkta ve ışıktta pigmentli (Skotokromojenler)	R/S	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. szulgai</i>
III	Yavaş	Karanlıkta ve ışıktta pigmentsiz (nonfotokromojenler)	R/S	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. terrae</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. ulcerans</i>
IV	Hızlı	Pigmentli veya pigmentsiz	Genellikle S	<i>M. fortuitum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i>

Mikobakteri cins içindeki 16S rRNA gen sekans benzerlikleri %94,3'ün üzerindedir. Türler arasındaki delesyonlar ve referans genleri de içeren filogenetik analizler, yavaş büyüyen tüm mikobakterilerin tek bir mikobakteriye ait olarak hızla büyüyen mikobakterilerden ortaya çıkan evrimsel daldan ayrılan doğal bölünmeyi doğrulamıştır (57). Bu özellik, insanları enfekte etme yetenekleriyle ilişkilidir ve bu nedenle tüm katı patojenler ve çoğu fırsatçı patojen, yavaş üreyen mikobakteriler ile yakınlık gösterir (58,59).

Mikobakteri cinsi katı patojen, potansiyel veya fırsatçı patojen ve patojenik olmayan saprofit türler içerir. Mikobakteriler, hastalık potansiyeleri ve in vitro üreme hızlarındaki temel farklılıklara dayalı *Mycobacterium tuberculosis* kompleksine (MTBK) ait olanlar, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium ulcerans* ve tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) olarak dört ana gruba ayrılabilirler. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks içerisinde *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis bacille Calmette-Guérin (BCG)*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. mungi*, *M. dassie bacillus*, *M. chimpanzee bacillus* ve *M. canettii* basilleri yer alır (55,60,61,62). Genom dizileme teknolojilerindeki gelişmelere paralel olarak yapılan kapsamlı karşılaştırmalı filogenetik analizler, mikobakteri türlerinin birbirleri ile ilişkilerinin araştırılmasına ışık

Mycolicibacter gen. nov. (“Triviale”), *Mycolicibacillus* gen. nov. (“Fortuitum-Vaccae”) ve *Mycobacteroides* gen. nov. (“Abscessus-Chelonae”) olarak isimlendirilmiştir. Eski *Mycobacterium* cinsinden 107 tür çıkarılarak yeni türler dahil edilmiştir. Buna göre majör insan patojenlerinin tümü *Mycobacterium* cinsi içinde yer alırken, çevresel mikobakteri türleri *Mycolicibacterium* cinsi, çoğu patojen olmayan nadiren hastalık etkeni olan türler ise *Mycolicibacter* ve *Mycolicibacillus* cinsi içinde yer alır. *Mycobacteroides* cinsinin ise bir kısım üyeleri akciğer, yumuşak doku ve deri enfeksiyonlarına sebep olduğu bilinmekle beraber yaşamı tehdit eden patojenler olarak kabul edilmezler. Yeni sınıflandırma ile yeni *Mycobacterium* cinsinin üyeleri olan ana insan ve hayvan patojen türler daha az klinik öneme sahip veya patojen olmayan tüm diğer türlerden ayırır (63).

Tür grubu birçok önemli zorunlu ve fırsatçı patojen içerdiğinden, türlerin herhangi bir şekilde yeniden adlandırılmasının, “*Nomen Periculosum*” kuralında özetlendiği gibi klinik tedavide karışıklığa neden olmaması önemlidir. Önerilen sınıflama ile klinikle kavram kargaşası oluşması, birçok otomatize cihazın kütüphanelerinde güncellemeler gerektirmesi gibi sıkıntılar ortaya çıkmıştır. Meehan C. ve arkadaşlarının yaptığı cins ayrımı sınırlarını 16S rRNA gen benzerliği, amino asit kimlik indeksi, ortalama nükleotit kimliği, hizalama fraksiyonu ve korunmuş proteinlerin yüzdesi ile tekrar değerlendiren çalışmada orijinal cins etiketinin, bu gruptaki tüm türlere yeniden uygulanmasını ve önerilen beş cinsin potansiyel olarak alt cins karmaşık adları olarak kullanılmasını önermişlerdir (65).

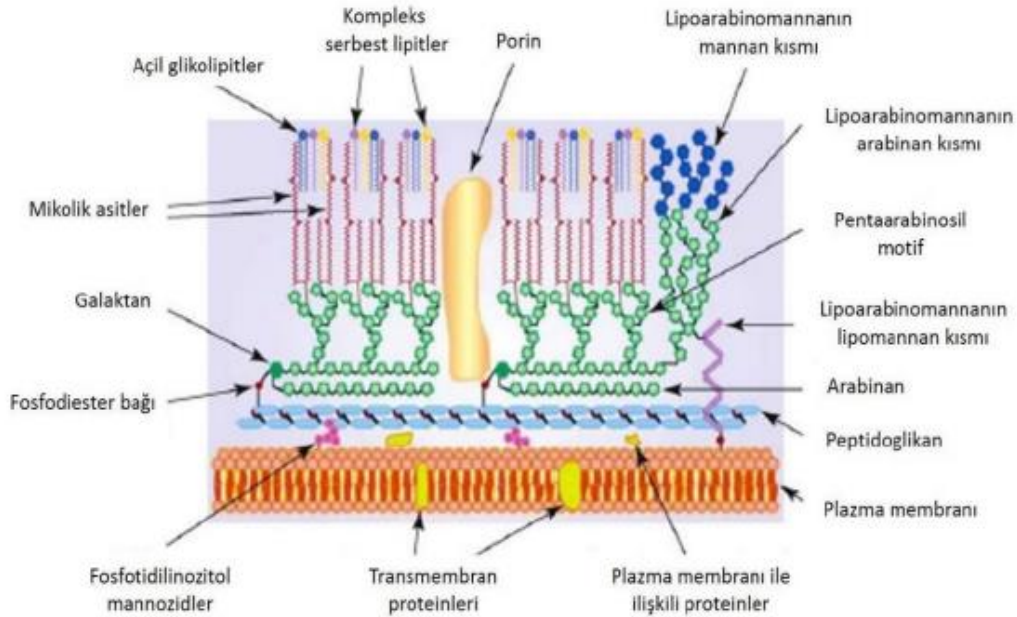
2.4. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Actinomycetales takımına ait *Mycobacteriaceae* ailesinin tek cinsi *Mycobacterium* cinsidir. Bakterilerin bu cins içerisinde sınıflandırılmasında asit-alkole dirençli olmaları ve hücre duvarlarında mikolik asit bulundurmaları etkilidir. İnce ve uzun, 0.2-0.6 µm x 1-10 µm boyunda, hareketsiz, katalaz pozitif, sporsuz ve zorunlu aerob bakterilerdir. Bazı türlerin mikroaerofilik koşullara da uyum sağlayabildikleri gösterilmiştir (66). Kapsül, flagel veya miçelleri bulunmaz. Diğer bakterilerin aksine, tüberküloz basilleri yavaş ve güç ürerler. Ortalama replikasyon zamanı 15-20 saattir. Üretilibilmeleri için son derece zenginleştirilmiş, sentetik veya yarı sentetik, katı veya sıvı bazlı besiyerlerine gereksinim duyarlar ve %5-8 CO₂ varlığı üremelerini hızlandırabilir. Tam yumurta, patates unu, gliserol ve çeşitli tuzlar içeren besi yerinde ürerler. Malaşit yeşili ve kristal viyole gibi anilin boyaları kullanılarak kontaminant bakterilerin üremesini engellediği görülmüş ve

zamanla geliştirilerek agar bazlı sıvı ve katı besi yerleri oluşturulmuştur. Biyotin, katalaz, albümin, kazein hidrolizati ile zenginleştirilmiş besiyerleri ve antimikrobiyal ve antifungal eklenerek daha seçici besi yerleri üretilmiştir. Optimal üreme ısıları türler arasında değişmekle beraber 37C° (28-42), pH 6.5-6.8'de en iyi ürerler. Koloni morfolojileri türe göre değişkendir, S tipi veya R tipi fotokromojen, skotokromojen veya nonkromojen koloni oluştururlar ve bu durum sınıflamanın temelini oluşturur (55,58,66).

2.4.1. Mikobakteri Hücre Duvarı Yapısı

Hücre duvar yapıları diğer bakterilerden farklı özellikte olup daha kompleks yapıya sahiptir. En iç tabakada plazma membranı yer alır. Temel yapı, tipik olarak gram pozitif bakterilerdeki gibi peptidoglikan içermekle beraber hücre duvarının omurgasını fosfodiester kovalent bağlarla birbirlerine bağlı peptidoglikan- arabinogalaktan- mikolik asit tabakaları oluşturur. Hücre duvar yapımından sorumlu proteinler, transport proteinleri ve mikolik asit katmanından pasif geçişten sorumlu porinlerde hücre duvarında yer alır. En dışta ise serbest lipidlerden oluşan bir dış katman bulunur. Mikobakterilerde plazma membranına tutunup hücre duvarının dışına kadar uzanan, konak ile patojen arasındaki etkileşimde ve mikobakterilerin sinyal iletiminde önemli rol oynayan fosfatidil-myo-inositol mannozidler, lipomannan ve lipoarabinomannan gibi bazı glikolipitler bulunur (67,68,69). **Şekil 2.10'**da mikobakterilerin hücre duvar yapıları ayrıntılı olarak görülmektedir.



Şekil 2.10. Mikobakterilerin Hücre Duvar Yapıları (69)

Mikobakterilerin lipidden zengin hücre duvar yapısı bakteriyi kompleman etkisiyle gerçekleşen osmotik lizisten, makrofaj içindeki oksidatif fagositozdan, asit, alkol, ağır metaller ve antimikrobiyal ilaç gibi fiziksel stres faktörlerinden korur. Laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan gram boyaları ile yüksek lipid içeriğine bağlı hidrofobik etkiden dolayı boyanmazlar. Ayrıca asit-alkol ile yapılan dekolorizasyonda da boyayı kolay bırakmazlar. Bu özelliklerinden dolayı aside dirençli bakteriler olarak da adlandırılırlar. Boyanın fenol içinde eritilmesi ve ısıtılması gibi yöntemler kullanan Ehrlich- Ziehl-Neelsen (EZN) ve Kinyoun teknikleri ile boyanırlar (70).

2.4.2. Genom Yapısı

Günümüzde yeni moleküler mikrobiyolojik teknikler ve çalışmalarla bakterilerin yapısal, fizyolojik, biyokimyasal, antijenik, genetik ve metabolizma özellikleri hakkında daha detaylı bilgilere ulaşılmıştır. Böylece türler arası ilişki ve hastalık patogenizi gibi konular daha da aydınlanırken aynı zamanda karmaşılaşmıştır. *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv,CDC1551), *M. bovis* (AF21.22/97) ve *M. lepra* gibi önemli patojen türlerde dahil birçok türün tüm genom analizi (WGS) yapılmıştır (70,71). Mikobakteriler DNA'larında yüksek (%62-70) G+C oranını olması nedeniyle stabil bir genoma sahiptirler. Mikobakteriyel genom *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* gibi hızlı üreyen bakterilerin genomundan daha küçüktür. Türler arasında değişmekle beraber yavaş üreyenlerde genom daha kısadır (58,71). Mikobakterilerde tanımlanan bazı türlerde genomun büyük kısmının (%59) replikasyonla ilgili, kalan bölgenin %30'unun lipid metabolizması ile ilgili, %10 kadarının ise hücre duvar sentez ve immün sistemden sorumlu proteinleri kodlayan genleri içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca noncoding diziler, insertion dizileri (IS) ve mikobakterieler için özel olan mikobakteri tekrarlayan üniteleri (MIRU) kodlayan gen bölgeleri tespit edilmiştir. Mikobakterilerde enerji üretim ve kullanımını sağlayan genlerin büyük kısmı gram negatif bakteri olan *E. coli* ve *pseudomonas*'larla benzerlik göstermektedir (70,71).

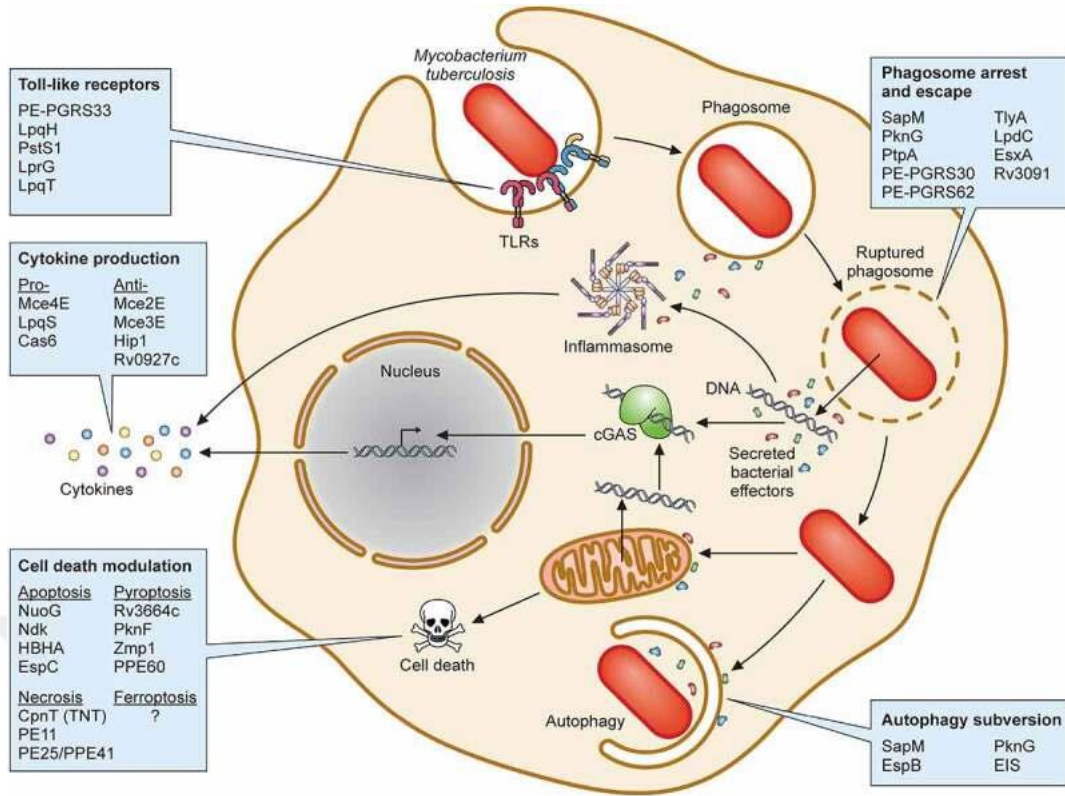
2.5. Virülans, Patogenez ve Klinik

Bilinen en başarılı insan patojenlerinden biri olmasına karşın, *M. tuberculosis*'in virülansında rol oynadığı bilinen endo veya ekzotoksinleri yoktur. Kord faktör (Trehaloz glikolipidler) ve sülfatidler gibi hücre duvarında bulunan bazı protein, lipid ve polisakkarit yapıların ve salgısal bazı proteinlerin virülanstan sorumlu olabileceği ortaya konabilmiştir. Bugün artık hastalığın patolojisinin altında yatan nedenin daha çok

konağın bakteriyel antijenlere karşı oluşturduğu abartılı hücre aracılı immün ve inflamatuvar yanıt sonucunda oluştuğu bilinmektedir (55,72). Mikobakterilerin antijenik komponentlerinin karakterizasyonu klonlama teknolojileri, dizi analizleri sayesinde hız kazanmış yeni proteomik yaklaşımların geliştirilmesi, patogeneizde rolü olan immün antijenlerin araştırılmasını sağlamıştır. Trehaloz dimikolat dimikoserosatlar, sülfolipid-1, fenolik glikolipid, mikolik asit, pentaasil trehaloz, fitioserol, mannosilatlı lipoarabinomannan (LAM) protein olmayan virülans faktörlerinden bazılarıdır. **Şekil 2.11**'de *M. tuberculosis*'in protein yapılı virülans faktörleri ve bunların etkili oldukları immünolojik yapılar özetlenmiştir (73).

Mikobakteriyel lipopolisakkaritler bakterilerin hücre içine alınmasında, makrofajların enfekte edilmesinde, fagozomun engellenmesinde ve anti-inflamatuvar yanıtta önemli rolleri alırlar. Protein yapılı olan virülans faktörleri Toll-like reseptör 2 (TLR2) aktivitesinde, sitokin üretiminde değişikliğe sebep olurken bazıları otofaji ve fagozom fonksiyonunda değişikliklerle ilişkilidir.

Mycobacterium tuberculosis kültürde ürettiğinde kültür ortamına birçok farklı antijen salınmaktadır. Filtreden geçebilen bu antijenlere “culture filtrate protein” (CFP) adı verilir. Bunların birçoğu bakteri genomunun RD1 lokusunda kodlanır ki bu lokus BCG suşunda ve tüberküloz dışı mikobakterilerde bulunmamaktadır. CFP-10 (10-kDa culture filtrate protein) ve Esat-6 (6-kDa early secretory antigenic target), antijen 85 kompleksi (Ag85) aşı ve tanı için kullanılan protein yapılardan bazılarıdır (72,73,74).



Şekil 2.11. *M. tuberculosis*'nin protein virülans faktörleri ve etkili oldukları immünolojik yapılar (73).

Tüberküloz vücudumuzda çeşitli organlarda enfeksiyon oluşturabilmesine rağmen büyük çoğunlukla akciğerleri tutar. Enfeksiyon, genellikle inhalasyon ile alınan içinde 1-3 basil içeren damlacık çekirdeğinin alveollere ulaşmasıyla başlar. Balgam yayması pozitif olan akciğer ve larinks tüberkülozlu hastalar en bulaştırıcı olanlardır. Hastalarla uzun süreli yakın teması olan kişilere bulaşma riski fazladır. Çocuklarda, diyabet hastalarında, HIV+ kişilerde hastalığa yakalanma riski yüksektir. Yaş, beslenme alışkanlıkları, kronik hastalıklar, immün baskılama oluşturan hastalıklar ve tıbbi durumlar, sigara/alkol kullanımı, sosyoekonomik düzey ve çevresel faktörler bulaşta ve hastalık nüksünde önemli etkiye sahiptir. Basilin akciğerde enfeksiyon oluşturmaması; bakterinin virülansına, inhale edilen basil sayısına ve konak immün sistemi ile ilişkisine bağlıdır (72,73,74,75). Basil yayan TB hastası ile temasta oluşabilecek klinik durumlar **Şekil 2.12'**da özetlenmiştir (7).

Yayma-pozitif hasta ile temaslı tüberkülin deri testi (TDT) negatif kişilerin %30'unda klinik ve radyolojik bulgu olmadan deri testi pozitif hale gelir. Primer enfeksiyon sonrası bu kişilerin %5'inde ilk beş yıl içinde erken hastalık gelişimi

```

graph LR
    A[Bulaştırıcı TB hastası ile karşılaşma] --> B[Enfeksiyon yok]
    A --> C[Enfeksiyon]
    B --> D[Primer veya progresif primer hastalık]
    C -- 5% --> D
    C -- 95% --> E[Latent enfeksiyon]
    F[Ekzojen yeni enfeksiyon] --> G[Hastalık]
    E -- "(Reaktivasyon) 5%" --> G
    E -- 90% --> H[Hastalık gelişmez]
  
```

The flowchart illustrates the progression of TB infection after exposure to a contagious TB patient. It starts with 'Bulaştırıcı TB hastası ile karşılaşma' (Contact with contagious TB patient). This leads to two outcomes: 'Enfeksiyon yok' (No infection) and 'Enfeksiyon' (Infection). From 'Enfeksiyon yok', the path leads to 'Primer veya progresif primer hastalık' (Primary or progressive primary disease). From 'Enfeksiyon', there are two paths: a 5% path leading to 'Primer veya progresif primer hastalık' and a 95% path leading to 'Latent enfeksiyon' (Latent infection). From 'Latent enfeksiyon', there are two paths: a '(Reaktivasyon) 5%' (Reactivation 5%) path leading to 'Hastalık' (Disease) and a 90% path leading to 'Hastalık gelişmez' (Disease does not develop). Additionally, 'Ekzojen yeni enfeksiyon' (Exogenous new infection) leads directly to 'Hastalık'.

Basil solunum yoluyla vücudumuza girdiğinde birkaç senaryo ile karşılaşılır. Alveollerde güçlü bir konak yanıtı ile herhangi bir lezyon oluşturmadan makrofajlar tarafından yok edilebilir. Klinik olarak oluşturduğu durumlardan sırasıyla aşağıda verilmiştir.

Miliyer Tüberküloz: Tüberküloz lezyonu içerisindeki ve çevresindeki kan damarlarının hasarı sonucu basillerin erken hematogen yayılımı ile immün sistemi zayıf kişilerde primer enfeksiyonun komplikasyonu olarak görülebilir. Başlangıçtaki miliyer tutulum vakaların %3'ünden azında görülür. En sık 2-3 yaş altı çocuklarda görülmekle birlikte erişkinlerde de görülebilir. En sık dalak, karaciğer, akciğerler tutulumu ile olup kemik iliği, böbrekler, santral sinir sistemi, böbreküstü bezi ve periton gibi tüm sistemleri tutulabilir (76).

26

malnutrisyon, tedavi almakta olan onkoloji hastaları, primer ve sekonder immün yetmezlik hastaları, immün baskılayıcı tedavi alma vb) durumlarda aktif TB gelişme riski belirgin düzeyde artar ve TB'un yayılması açısından bu tür hastalar çok önemlidir.

Tüberküloz enfeksiyonunun tüberküloz hastalığına dönüşmesini artıran durumlar aşağıda özetlenmiştir (7,78).

Yüksek Risk

- HIV enfeksiyonu olan kişiler
- 0-2 yaş aralığındaki temaslı çocuklar
- TNF alfa inhibitörleri kullanan hastalar
- Hemodiyaliz yapılan kronik böbrek yetmezliği
- Organ ve kök hücre transplantasyonu yapılanlar
- Son 2 yılda gelişen yeni TB enfeksiyon

Orta-Düşük Derecede Risk

- 3-5 ile 10-15 yaş aralığında temas öyküsü olan çocuklar
- Silikoz
- Bir aydan uzun süreli (≥ 15 mg prednizon) sistemik steroid tedavisi alanlar
- Vücut kitle indeksi ≤ 20 olanlar
- Alkol, sigara (günde 1 paket) bağımlılığı
- Diabetes mellitus
- İnhal steroid tedavisi kullananlar

Endojen Reaktivasyon: Primer enfeksiyonda oluşan odaklarda latent halde kalan basillerin hayatın herhangi bir döneminde aktif hale geçmeleri ile oluşan hastalığı ifade eder (7).

Ekzojen Reinfeksiyon: Daha önce primer enfeksiyon geçirmiş konağın aktif tüberkülozlu bir hastadan yeniden virulan MTBK ile enfekte olmasını tanımlar (68).

Tüberküloza karşı immün yanıtta doğal ve kazanılmış bağışıklık rol alır. Bakterinin akciğerler alveollerine ulaşmasıyla doğal bağışıklık hücreleri tarafından tanınan MTBK çeşitli sitokin ve kemokinler salınımına neden olur. Basil makrofajlar tarafından fagosite edilerek lizozomla birleşip fagozom oluşumu sağlanır. Basil tarafından salgılanan ESAT-6, CFP-10, SecA 1/2 proteinleri ve protein kinaz G fagozomal olgunlaşmasını engeller. ESAT-6 makrofajların IL-6, IL-12 ve TNF- α üreten enflamatuvar özellikli fenotipe dönüşmesini uyarır (79,80). Daha sonra IL-10 üretimini uyaran fenotipe dönüşümü indükleyip kendine uygun ortam sağlayarak çoğalır. Bu denge

sayesinde yıllarca sessiz kalır ve latent enfeksiyon oluşur. Aktive T lenfositlerin enfeksiyon bölgesine hareketi sonucu; bu bölgede makrofajlar, T-lenfositleri, dendritik hücreler, fibroblastlar, endotelial hücrelerin birikimi ile granülom oluşumu gerçekleşir. Mikobakteriyel enfeksiyona direnç, granümatöz yanıtın büyüklüğünü belirler. Bazı hastalıklarda; ör, HIV pozitifliği, Diabetes mellitus gibi durumlarda yetersiz granülom yanıtı gözlenir ve enfeksiyon daha yaygın şekilde gelişim gösterir. Tümör nekroz faktör-alfa granülom oluşumunda etkili olan bir diğer pro-inflamatuvar sitokindir. Romatoid artrit tedavisinde kullanılan anti-TNF antikörler latent TB'un alevlenmesine sebep olabilmesi nedeniyle tedavi öncesi bu tür hastaların iyi değerlendirilmesi gerekir.

Mycobacterium tuberculosis'e karşı geliştirilen tek lisanslı aşı olan; BCG aşısı 1927 yılından itibaren uygulanmaktadır (7,80). Aşının geliştirilmesi 13 yıl kadar sürmüştür. Stop TB Ortaklığının TB'yi Bitirmek için Küresel Planı, 2025 yılına kadar yeni bir TB aşısının kullanıma sunulması hedefini belirlemiştir ve bu bağlamda DSÖ öncülüğünde 16 aşı adayı farklı faz aşamalarında değerlendirilmeye devam etmektedir (81). Günümüzde enfeksiyonu, hastalığı ve nüksünü önlemeye yönelik çok sayıda aşı geliştirme çalışmaları devam etmekte olup bunlardan bazıları faz III aşamasına gelmiştir. M72/AS01E (Protein/adjuvan alt birim aşısı), rBCG (tüm hücreli *M. bovis*), GamTBvac (protein/adjuvan alt birim aşısı), MTBVAC (canlı, genetik olarak zayıflatılmış MTB), VPM1002 (canlı rBCG), MIP (tam hücreli *M. indicus pranii*) faz çalışmaları devam eden bazı aşılardır. Ayrıca viral vektör, mRNA, protein adjuvan subunit, zayıflatılmış farklı veya aynı mikobakteri türlerini içeren çalışmalarda mevcuttur. Tüm bu çalışmaların umut vaat ediyorsa da tek aşı halen BCG'dir (82).

2.6. Tüberküloz Tanısı

2.6.1. Klinik Tanı

Tüberküloz enfeksiyonu MTBK basilleri tarafından çoğunlukla akciğeri hedef alan (pulmoner TB) ancak lenfatikler ve kan dolaşımı yolu ile yayılarak diğer sistemleri de (ekstrapulmoner TB) tutabilen bir enfeksiyon hastalığıdır. Enfekte olanların yaklaşık %5-10'u yaşamları boyunca, çoğu ilk enfeksiyondan sonraki ilk beş yıl içinde olmak üzere TB hastalığına yakalanır. Yapılan çalışmalarda tüberkülozlu biriyle temas ettikten sonra aktif hastalık geliştiren kişilerin yaklaşık %75'inin bunu indeks hastanın tüberküloz tanısından sonraki bir yıl içinde; %97'sinin ise iki yıl içinde geliştiği gösterilmiştir (83,84). Akciğer TB enfeksiyonunun gelişimi fagositoz, hücre içi çoğalma, enfeksiyonun

gizli fazı ve aktif akciğer enfeksiyonu şeklinde gerçekleşir. Birçok değişkenin etkisiyle spontan iyileşme, hastalık, gizli enfeksiyon (latent TB), reaktivasyon veya reenfeksiyon gibi farklı klinik durumlara doğru ilerler.

Tüberküloz tanısı klinik şüphe ile başlar ve kapsamlı bir yaklaşım gerektirir. Hastanın öyküsü, şikayetleri, fizik inceleme bulguları, akciğer grafisi, deri testleri, mikrobiyolojik tanı birlikte değerlendirilmelidir. İki haftadan uzun süren öksürük, kan tükürme, nefes darlığı, ateş, gece terlemesi, halsizlik, göğüs veya yan ağrısı, iştahsızlık, zayıflama (kilo kaybı), çocuklarda kilo alamama olan hastalarda TB'dan şüphelenmek gerekir. Yakınmaların çoğunlukla hafif başlayarak yavaş ilerlemesi, kliniğinin birçok hastalıkla benzerlik göstermesi gibi nedenlerle hastaların doktora başvurusu gecikir ve tanıda gecikmeler yaşanır. Yakın ve uzun süreli teması olan kişilere bulaşma riski fazla olması nedeniyle öyküde hasta kişilerle temasının sorgulanması da önemlidir. Aile bireyleri, aynı evi paylaşan arkadaşlar ve işyeri arkadaşları dikkatle sorgulanmalıdır (83,84).

Akciğerler, TB'un hem hastaya ana giriş yolu ve hem de vücuda ve diğer kişilere yayılmasında kaynak görevi görür. Akciğerlerde ya primer enfeksiyon ya da latent TB aktivasyonuna bağlı olarak klinik tablo oluşur. İlk karşılaşmada basil yüklü damlacık çekirdeklerinin enfeksiyonu ile akciğerin çoğunlukla periferinde lokalize bir enfeksiyon oluşur. Bu sırada hafif ateş ve halsizlik gelişir ve bazen diğer aşırı duyarlılık belirtileri görülür. Hastaların çoğunda süreç lokal ve sistemik savunma mekanizmalarıyla kontrol altına alınır. Primer pulmoner odak genellikle subplevral olduğundan, plevral boşluğa rüptür, efüzyonlu tüberküloz plörezi gelişimi ve bulgularına da rastlanabilir. Hiler lenf düğümlerine yayılma ile büyüme, merkezinde kazeöz nekroz ve kalsifikasyon oluşur. Primer enfeksiyon sıklıkla klinik olarak önemsizdir ve tanınmaz. Semptom ve bulgular primer ve sekonder enfeksiyonda değişen sıklıkta görülmekle beraber en sık ateş görülmektedir (76). Ateş genellikle öğleden sonra gelişir ve uykuda terleme eşlik edebilir. Halsizlik, sinirlilik, olağandışı yorgunluk, baş ağrısı ve kilo kaybı gibi diğer toksemi belirtileri ve hemoptizi, öksürük, balgam ve göğüs ağrısı mevcut olabilir. Bu bulguların varlığı ve yokluğu tanıda önemlidir. Dünya Sağlık Örgütü, genel popülasyonda ve yüksek riskli gruplarda (HIV+ kişiler hariç) TB hastalığı tarama algoritmalarında klinik semptomların varlığına yer vermiştir (85). Herhangi bir öksürüğün TB hastalığının saptanmasında duyarlılığının %51 olduğunu tahmin edilmesine rağmen oldukça yüksek bir özgüllüğe (%88) sahiptir. Taranan popülasyondaki TB dışı hastalıkların ve diğer durumların yaygınlığına bağlı olarak bu durum bize TB hastalığı olmayan çoğu kişinin

öksürmediğini düşündürür. İki haftadan uzun süren öksürük için ise duyarlılık %42, özgülük ise %94 olduğu tahmin edilmektedir. Herhangi bir TB semptomu (öksürük, hemoptizi, ateş, gece terlemeleri, kilo kaybı) için taramanın tahmini duyarlılığı %71, tahmini özgülüğü ise %64'tür (86). Ayrıca DSÖ, TB önleyici tedavi vermeden öncede hastalığı ekarte etmek için semptomların yokluğuna yönelik taramanın kullanımını önermektedir. Beş yaş ve üzeri HIV-negatif ev temaslıları ve diğer klinik risk grupları, herhangi bir süre öksürüğün, hemoptizi, ateş, gece terlemesi, kilo kaybı, göğüs ağrısı, nefes darlığı veya yorgunluk olmaması %73'lük bir duyarlılıkla ve %99'luk negatif prediktif değerle tanıda önemlidir (83,87). On yaş ve üzerindeki HIV'li hastalar için standart dört belirti taramanın uygulanması önerilmektedir. Tüberküloz semptomlarının olmaması ve anormal göğüs radyografik bulgularının olmaması, önleyici tedaviden önce ≥ 5 yaşındaki HIV negatif ev temaslıları ve diğer risk grupları arasında aktif tüberküloz hastalığını ekarte etmek için kullanılabilir (78).

Fizik muayene hastalığın tanısında ve ayırıcı tanıda ihmal edilmemelidir. Akciğer tüberkülozunda oskültasyonda lokalize raller, öksürük sonrası raller, konsolidasyon varlığında bronşiyal sesler duyulabilir, plevral sıvıya bağlı seslerde azalma ya da solunumla değişen plevral sürtünme sesleri duyulabilir. Hepatosplenomegali nadiren görülebilir. İlerlemiş hastalıkta çomak parmak, genel durumda bozulma, kaşeksi görülebilir. Ekstrapulmoner tüberkülozda ilgili organ tutulumuna ait bulgular izlenir (7). Öksürük ve akciğer seslerini algılayan ve izleyen birkaç yeni yapay zeka tabanlı araç (Hyfe, Docturnal, ResApp Health, Salcit Technologies) geliştirilmiş olup öksürüğü TB için daha nesnel olarak ölçülebilir bir biyobelirteç haline getirerek TB taraması, tanı ve tedavi izlemede kullanıma sunmuştur (82,88).

Belirgin bir klinik durumun gözlenmediği LTBE'de özellikli grupları belirleyerek tedavi etmek tüberkülozla mücadelenin önemli bir bileşenidir. Tüberküloz basili ile karşılaşmış herkese koruyucu tedavi vermek pratikle bağdaşmaz ve gereksizdir. Bu nedenle sadece bu tedaviden yarar görecekler test edilmelidir. Dünya Sağlık Örgütü koruyucu tedaviyi bakteriyolojik olarak kanıtlanmış akciğer TB'lu hastaların ev içi temaslıları, HIV ile enfekte hastalar ve klinik olarak risk grubundaki kişilere önermektedir (78,83). Latent tüberküloz tanısında altın standart bir test olmamakla birlikte, TDT ve interferon gama salınım testi (İGST) bu amaçla kullanılır. Moleküler mikrobiyolojideki gelişmeler daha spesifik biyobelirteçlerin tespitine olanak sağlamış buna paralel olarak daha hassas testlerin geliştirilmesi mümkün olmuştur. ESAT-6 ve CFP-10 antijenleri kullanılarak spesifik MTBK antijenlerine dayalı daha yeni antijen

bazlı deri testleri (TBDT) geliştirilmiştir. Tüberküloz basiline karşı gelişmiş hücresel bağışıklık yanıtını ölçen bu testler aktif TB ve LTBE’de de pozitif olduğundan iki durum arasındaki ayrımı yapamazlar. Ayrıca TDT ve İGST’de pozitif sonuç, tek başına aktif hastalığa ilerleme riskinin güvenilir bir göstergesi değildir (7,77,89). Dünya Sağlık Örgütü bu testlerin her üç grubunu da TB tanısı için kullanımını önermiştir. Fakat IGRA’lar ve TST’nin düşük ve orta gelirli ülkelerde pulmoner veya ekstrapulmoner TB tanısı veya aktif tüberküloz olduğundan şüphelenilen yetişkinlerin (HIV+ kişiler dahil) tanısal tetkikleri kullanılmamasını önermektedir (89).

Tüberkülin Deri Testi (TDT)

Tüberküloz enfeksiyonun dolaylı yoldan gösteren bir cilt testidir. Daha önce enfeksiyona bağlı duyarlı hale gelen T hücrelerinin intradermal uygulanan PPD antijenlerine karşı geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturması ilkesine dayanır. Mantoux tarafından kullanılan PPD 1960’larda MTBK’den türetilen standartlaştırılmış bir saflaştırılmış protein (PPD-S) ile değiştirilmiştir. PPD-S, MTBK’e özgü olanların yanı sıra TDM ve BCG’de bulunan antijen karışımı içerir. Bu nedenle, yanlış pozitif reaksiyonlar TDM enfeksiyonlarında ve BCG aşısı olanlarda görülebilir. PPD-S’in 0,1 mg/0,1ml dozda ön kol iç yüzeye intradermal uygulama sonrası oluşan reaksiyon 5-6 saatte başlar ve 48-72 saatte maksimuma ulaşır. Kolda oluşan endurasyon işaretlenip mm cinsinden ölçülerek not edilir (90). Değerlendirirken baz alınacak değerler BCG aşılı ve aşısızlarda farklıdır. Yalancı pozitif durumlar olduğu gibi aktif tüberküloz hastalarında %25’e varan oranlarda yalancı negatif gözlenebilir. Miliyer tutulum, tüberküloz menenjit, malnütrisyon gibi test edilen kişiye ait faktörler; kullanılan tüberküline ait faktörler, uygulamaya ait yöntemlerden kaynaklı yalancı negatiflik görülebilir.

Tüberküloz Antijenine Dayalı Deri Testleri (TBDT)

Tüberküloz basiline özgü antijenlerden olan ESAT6 ve CFP10’yi kullanarak TB enfeksiyonunun tespitinde hücre aracılı immünolojik yanıtı ölçmek için deri testleri geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda kanıtlar, bu testlerin IGRA’ya benzer özgüllük ve hassasiyette olduğunu göstermektedir ve TDT ile karşılaştırıldığında çocuk, ergen ve HIV+ kişilerde daha güvenilir sonuçlar sağlayabileceği gösterilmiştir. Ayrıca TDT’ye benzer bir güvenlik profiline sahip olduğu, uygun maliyetli, kabul edilebilir ve uygulanabilir olduğunu gösterilmiştir. Özellikle önceden BCG aşılama öyküsü olan popülasyonlarda özgüllük, IGRA’ninkine benzer ve TST’ninkinden daha iyi bulunmuştur. Dünya Sağlık Örgütü, Cy-Tb (Serum Institute of India, India), Diasintest® (Generium, Russian Federation) ve C-TST (ESAT6-CFP10 test, Anhui Zhifei Longcom, China) bu

testlerin LBTE tanısında kullanılmasını önermektedir (86,89). Tüm testlerde TDT'de olduğu gibi intradermal antijen enjeksiyonu yapılarak oluşacak endurasyon 48-72 saat sonra milimetre cinsinden okunur.

İnterferon Gama Salınım Testleri (İGST)

Hastanın kanı (tam kan), *M. tuberculosis*'e özgü antijenlere maruz bırakılarak gece boyunca inkübasyon sırasında dolaşan lenfositler tarafından salınan interferon-gamayı ELISA ile veya IFN- γ (İnterferon-gamma) üreten T-lenfosit sayısını ELISPOT yöntemi ile ölçen in vitro kan testleridir. QuantiFERON-TB Gold (ESAT-6 ve CFP-10) ve daha yeni sürüm QuantiFERON-TB Gold In-Tube (ESAT-6, CFP-10 ve TB7.7) ile enfeksiyonu kapmış bir bireyin T hücrelerinin yeniden uyarılması ile oluşacak yanıtta salgılanan IFN- γ ölçülür. T-Spot testte ise ESAT-6 ve CFP-10 ile stimülasyondan sonra IFN- γ üreten periferik mononükleer hücrelerin sayısı ölçülür. İn vitro olan bu testlerin laboratuvar altyapısı ve nitelikli personel gerektirmeleri ve pahalı olmaları dezavantajlarındandır. Deri testinden farklı olarak, IGRA'lar önceki BCG aşılamasından veya TDM enfeksiyonundan (*M. kansasii* , *M. szulgai* ve *M. Marinum hariç*) etkilenmezler.

Tüberküloz olduğu varsayılan bireylerde aktif TB'yi saptamada IGRA'ların hem duyarlılığı hem de özgüllüğü yetersizdir. Ayrıca bu testler pulmoner ve ekstrapulmoner TB'nin geleneksel mikrobiyolojik teşhisinin yerine kullanılamazlar (83,87). Dünya Sağlık Örgütü, TB teşhisi için IGRA'ların kullanımına ilişkin önerilerde bulunmuş ve günümüze kadar QIAGEN QuantiFERON®-TB Gold (QFT-G), QIAGEN QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT), Oxford Immunotec T-SPOT®.TB (T-Spot), Beijing Wantai's TB-IGRA ve QIAGEN QuantiFERON-TB Gold Plus sistemlerinin kullanımını önermiştir (83,87).

2.6.2. Radyolojik Tanı

Doğru bir radyolojik değerlendirme için çekilen filmin uygun teknikle doğru kalitede, derin inspirasyonda görüntülenmiş olması gereklidir. Bulgular primer ya da sekonder TB'da değişmekle beraber akciğer tüberkülozunda hemen daima radyolojik bulguya rastlanır. Nadiren akciğer filmi normal görünümündedir. Ranke kompleksi olarak adlandırılan parankimde bir lezyon ile drene olunan lenf bezinde kalsifikasyon görülebilir. Anormal boyutta hilus ve mediastende lenf bezi, konsolidasyon, atelettazi, plörezi, kavitasyon, fibrozis ve hacim kaybı görülebilecek bulgular arasındadır. Sekonder TB'da en sık üst lob apikal, posterior ve alt lob apikal segment tutulumuna bağlı bulgular

görülmekle beraber hiçbir radyolojik görüntü tüberküloza spesifik değildir (76,91). Akciğer grafilerinin, aktif TB tanısında duyarlılığı %70-80 arasında, özgüllüğü ise %60-70 arasında değişmektedir (7). Tüberküloz tanısında en büyük sorun filmi okuyanlar arasındaki farklı yorumlardır. Dünya Sağlık Örgütü, bu gibi sıkıntıların azaltılması için tanı ve taramada dijital göğüs radyografilerinde TB taraması yapmak için yapay zekâ kullanan Dijital Göğüs Radyografisi için bilgisayar destekli tespit (CAD) yazılım ürünü (CAD4TB v6, Delft Imaging, Netherlands; Lunit INSIGHT CXR (TB algorithm v4.9.0), Lunit, Republic of Korea; qXR v2, qure.ai, India) kullanımına onay vermiştir (88). Bu yazılımının tanısal doğruluğu ve genel performansının hem tarama hem de triyaj bağlamlarında bakteriyolojik olarak doğrulanmış TB'yi tanımlama becerileri açısından insan tarafından dijital grafi yorumlanmasına benzer olduğu bulunmuştur (92). Tüberküloz taramasının önerildiği popülasyonlarda 15 yaş ve üstü bireyler arasında, TB hastalığı için tarama ve triyaj amacıyla dijital göğüs röntgenlerini yorumlamak için insan okuyucuların yerine CAD kullanılabilir (93).

2.6.3. Mikrobiyolojik Tanı

Tüberküloz hastalığı tanısında klinik, radyolojik bulgular ve deri testlerinden yararlanılmakla beraber hastalığın enfeksiyöz ajan kaynaklı olması nedeniyle kesin tanısı mikrobiyolojik olarak konulur. Günümüzde moleküler tekniklerin ilerlemesine paralel daha hızlı ve doğru tanı mümkün olmakta özellikle az ve orta gelirli ülkelerde testlere ulaşımın çeşitli nedenlerle kısıtlı olması dolayısıyla tanıda konvansiyonel yöntemler halen önemini korumaktadır. Mikrobiyolojik tanıda kullanılan yöntemler arasında mikroskopik inceleme, kültür, serolojik ve moleküler testler yer alır. Klinik olarak şüphelenilen hastadan uygun klinik örneğin kaliteli ve dikkatli şekilde alınarak laboratuvara ulaştırılması gerekir. Örnek tipi enfeksiyonun yeri ve türüne göre değişmekle birlikte, tanıda en sık kullanılan örnekler arasında balgam, bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL), mide açlık sıvısı, apse, biyopsi doku parçaları, idrar ve BOS yer alır. Balgam ve steril olmayan bölge örnekleri N-asetil-L-sistein + sodyum hidroksit (NaOH) ile dekontaminasyon, homojenizasyon ve konsantrasyon işlemlerine tabi tutularak kültürde yanlış üremeler önlenerek basil yakalama şansı artırılır (94,95).

Mikroskopik İnceleme

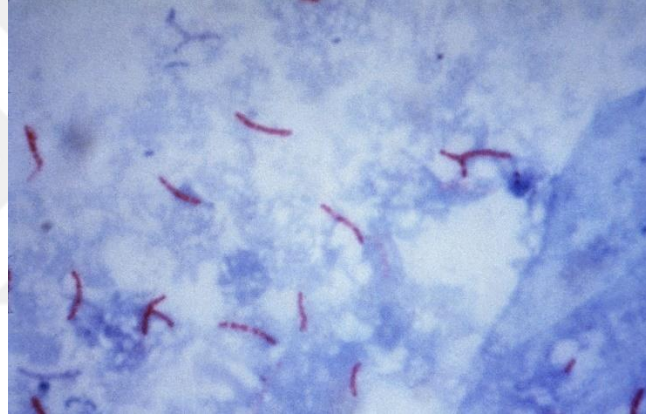
Tüberküloz tanısında klinik örneklerin mikroskopik olarak incelemesi en hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Bu yönüyle tanıda düşük ve orta gelir düzeyi olan ülkelerde daha belirgin olarak önemini korumaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, 2022

raporunda 2021 yılında yayma mikroskopisi kullanılarak insanların üçte ikisine TB teşhisi konmuştur. Farklı türde boyama yöntemleri ve mikroskoplar kullanılmaktadır. Bu amaçla, karbol fuksin boyama (EZN, Kinyoun yöntemi) ve florokrom boyama (Auramin O, Auramine-rhodamine) yöntemleri mevcuttur. Hücre duvar yapılarındaki lipid oranlarının fazla olmasından kaynaklanan aside dirençli boyanabilmelerinden yararlanarak geliştirilmiş olan EZN boyama en sık kullanılanıdır. Mikroskopik incelemede basilin gösterilebilmesi için klinik örnekte 5000–10.000 CFU/mL konsantrasyonda bakteriyi bulunması gerekmektedir. Genel olarak karbol fuksin boyalı mikroskopi, %46-78 duyarlılığa sahiptir. Numunenin kaynağına ve dahil olan mikobakterilere bağlı olarak özgülük neredeyse %95'in üstündedir. Ayrıca hastadaki basil yükü, bulaştırıcılık ve tedavi takibi hakkında yorum yapabilmemizi de sağlar. Sonuçlanması için örnekte basil miktarının çok olması ve duyarlılığının düşük olması, tür düzeyinde tanımlama yapılamaması ve bakterinin canlılığı hakkında fikir vermemesi gibi dezavantajları vardır (96). **Şekil 2.13**'te EZN yöntemiyle boyanmış preperatta basilin mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. Hasta sonucunun raporlanmasında örnekte alanda görülen basil yoğunluğunun derecelendirilmesine bağlı 1+, 2+, 3+, 4+ gibi ifadeler yer alır. **Tablo 2.4**'te farklı mikroskopi ve boyama türlerinin değerlendirilen alan ve basil sayısına göre sonuç yorumları yer almaktadır. Negatif örnek diyebilmek için ışık mikroskobu ile $\times 1000$ büyütmede en az 300 alan değerlendirilmesi gerekmektedir.

Florasan boyamada Auramin O, Auramine-rhodamine gibi boyalar kullanılarak floresan mikroskobunda sarımsı-turuncu renkte floresan veren basiller görülür. Böylece daha düşük büyütmelemlerde ile daha kısa zamanda daha geniş preperet alanı taranabilir. Light emitting diodes (LED) temelli mikroskopların geliştirilmesiyle mikroskopik değerlendirmelerde alternatif oluşmuştur (7,88,94). Ülkemizde yapılan bir çalışmada TB tanısında LED floresan mikroskobunun duyarlılığı EZN'ye göre %12.7 fazla olduğu ve %69 daha fazla zaman tasarrufu sağladığı bulunmuştur (97). Dünya Sağlık Örgütü, floresan mikroskop kullanan laboratuvarlarda LED mikroskopların kullanımına geçilmesini ve konvansiyonel ışık mikroskobuna alternatif olarak LED mikroskobunun aşamalı olarak devreye sokulmasını önermektedir (98).

Tablo 2.4. Yaymaların Farklı Mikroskopi ve Boyama Türlerine Göre Sonuç Yorumları
(7)

Taranan alanda görülen ARB sayısı			
	Karbol fuksin boyama	Florokrom boyama	
	X1000 büyütme	X250 büyütme	X400 büyütme
Negatif	0	0	0
Şüpheli	1-2 adet / 300 alanda	1-2 adet / 30 alanda	1-2 adet / 70 alanda
+1	1-9 adet / 100 alanda	1-9 adet / 10 alanda	2-18 adet / 50 alanda
+2	1-9 adet / 10 alanda	1-9 adet / 1 alanda	4-36 adet / 10 alanda
+3	1-9 adet / 1 alanda	10-90 adet / 1 alanda	4-36 adet / 1 alanda
+4	> 9 adet / 1 alanda	>90 adet / 1 alanda	>36 adet / 1 alanda



Şekil 2.13. ARB boyalı *M. Tuberculosis* basil ışık mikroskopi 1000 x büyütme görünümü

Kültür

Tüberküloz tanısında halen önemini koruyan ve altın standart yöntem olan kültür; hasta takibini değerlendirmek, tedaviyi onaylamak, mikobakteriyel tür tayini ve İDT yapmak için kullanılır. Klinik örnekte mililitrede en az on basil bulunması izolasyon için yeterlidir. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olmasına rağmen sonuçlanması için uzun süre geçmesi dezavantaj oluşturur. Geleneksel kültür yönteminde ilk sonucun alınması genellikle iki haftadan fazla sürer ve bu da tedaviyi geciktirir ve diğer olası hastalık tanılarına odaklanmaya neden olabilmektedir.

Günümüzde katı ve sıvı besiyerleri kültürde kullanılmaktadır. Katı besi yerleri agar (Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11) ve yumurta bazlı (Löwenstein-Jensen;

LJ, Petragani, American Trudeau Society ve Ogawa) olabilirler. En sık kullanılan katı besiyeri LJ olup Middlebrook 7H9 ve 7H12 sıvı besiyerleri arasındadır.

Katı besiyeri kültürünün uzun sürmesi nedeniyle basilin daha erken tespit edilebilmesini sağlayan otomatize ve yarı otomatize sıvı kültür sistemleri geliştirilmiştir (99). Dünya Sağlık Örgütü 2007 yılında, TB'un tanımlanması ve İDT testi için sıvı kültür sistemini onaylamıştır (100). BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube-960 (MGIT-960; BD Biosciences, Sparks, MD), BACTEC900MB (BD Biosciences, Sparks, MD), VersaTREK (ESP Culture System II; Trek Diagnostics, USA), MB/BacT ALERT 3D (BioMérieux, NC) gibi ticari sistemler bulunmaktadır. Kültür için katı besiyerlerinde 4-5 haftada, sıvı besiyerlerinde 2-4 haftada ve otomatize sistemlerde ise 5-8 günde üreme saptanabilmektedir (83,99,101).

MGIT960 sistemi modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bulunan tüplerin kullanıldığı bir sistemdir. Kültür tüplerinin inkübasyonu cihaz içinde yer alır ve üreme kontrolü otomatik olarak yapılır. Tüpün tabanında silikona gömülü oksijene bileşik durumda olan floresan veren indikatör olan rutenyum metal kompleksi yer almaktadır. Mikobakterinin üremesi durumunda oksijen kullanımına bağlı indikatör silikon tabakaya gönderilen ultraviyole ışınına karşı floresans ışımı meydana gelir. Işıma sistem tarafından otomatik olarak floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilerek üreme bildirilir (99,101,102,103).

BacT/Alert 3D sisteminde MB7H9 sıvı besiyeri kullanılmaktadır. Kültür şişelerinin dip kısmında mikobakteriyel üremeye bağlı oluşan metabolik çözünmüş CO₂ değişime ve bunun sonucunda değişen pH'ya duyarlı renk değişikliğine duyarlı sensör bulunmaktadır. Kolorimetrik sensörlü bilgisayar destekli kapalı bir sistemden oluşur (104). Pozitif üreme olması halinde sensörün rengi koyu yeşilden sarıya dönmektedir.

VersaTREK (ESP Culture System II) sistemi; akciğer dokusunu taklit ederek üremeyi artıran sünger parçaları içeren Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri kullanan bir sistemdir. Bilgisayar destekli olan sistem mikobakterilerin üremesi sonucu besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişikliği ölçer (96,105).

2.6.4. Moleküler Tanı Testleri

Moleküler biyoteknolojik gelişmelerle TB'la mücadelede tanı, tedavi, takip, tarama ve önleme aşamalarında ışık tutacak nitelikte ilerlemeler kaydedilmiştir. Bunlar arasında, özellikle özgüllük açısından tüberkülin deri testlerinden daha iyi performans gösteren, rekombinant antijenlerine dayalı deri testleri; yeni nesil yanal akışlı LAM

testleri; dirençli TB'yi doğrudan balgam örneklerinden saptamak için amplifikasyona dayalı hedeflenen yeni nesil dizileme (NGS) testleri; İDT için broth mikrodilüsyon yöntemleri; TB enfeksiyonu için IGRA'lar ve dijital göğüs radyografilerinde TB taraması yapmak için yapay zeka ve bilgisayar destekli tespit (CAD) yazılım ürünleri sayılabilir.

Medikal piyasada çok sayıda nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT) mevcuttur olup bu ürünler otomatik, düşük ile orta düzeyde karmaşıklığa sahip ve hem TB'yi hem de çeşitli TB ilaç direncini saptayabilirler. Dünya Sağlık Örgütü, 10 yıldan uzun süredir hızlı moleküler tanı yöntemlerini klinik örnekten tanı ve ilaç direncinin belirlenmesinde kullanımını önermiştir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen hızlı moleküler test 2020'de yeni tanı alan 5,8 milyon kişinin 1,9 milyonuna (%33) ilk tanı testi olarak kullanılmıştır. Bu değer 2019 yılına göre %28'lik bir artış gösterse de testlerin kullanımı halen istenilen ve yeterli düzeyde değildir (106). Tüberküloz için DSÖ tarafından onaylanan ve önerilen testler **Şekil 2.14, Tablo 2.5 ve Tablo 2.6'**da özetlenmiştir (8).

Ayrıca DSÖ, ARB yayma incelemeleri için balgam konsantrasyonu ve dekontaminasyon yöntemlerini; rifampisin direncinin hızlı tespiti için faj plak yöntemi; hızlı kültür ve İDT için ince tabaka agar yöntemlerini incelemiş ve önerilen kullanımları destekleyecek kanıtların yetersiz olması nedeniyle önermemiştir. Tüberküloz için ticari serodiagnostik testler ve tüm ortamlarda aktif TB'yi tespit etmek için IGRA'ların düşük ve orta gelirli ortamlarda kullanılmamasını önerilmiştir (8).

Tüberküloz tanısında moleküler yöntemler klinik örnekten tanı konulması, tür tanımlaması, ilaç direncinin saptanması ve genotiplendirme amacı ile kullanılırlar.



Şekil 2.14. Tüberküloz için başlangıç testleri olarak DSÖ tarafından önerilen hızlı teşhis test platformları (107), 2022

Tablo 2.5. TB ve ilaç direnci tanısı için DSÖ tarafından önerilen yöntemlerin özeti (8).

Pulmoner ve ekstrapulmoner TB şüphesinde ilk tanı testi olarak kullanılan geleneksel testler	
TB tanı veya tedaviyi izlemek için MTBK saptamaya yönelik ARB yayma mikroskopisi	• Ziehl– Neelsen boyamalı geleneksel ışık mikroskobu • Geleneksel floresan mikroskopisi • LED floresan mikroskopisi
TB tanı veya tedaviyi izlemek veya İDT için MTBK'yi izole etmek için kültür testleri	• Katı besi yeri: Löwenstein–Jensen; Middlebrook 7H10 veya 7H11 • Sıvı besi yeri: örneğin BACTEC-TB, MGIT-960 TB, VersaTrek-TB
Pulmoner TB şüpheli kişilerde ilaç direnç tespiti olmadan MTBK tespit etmek için ilk tanı testi olarak kullanılan hızlı testler	
MTBK tespiti için NAAT	• Loopamp MTBK kit • Fluorotype MTB yöntemi
HIV+ TB için hızlı antijen tespit testi	• LF-LAM yöntemi: örneğin Alere Determine™, Urine TB LAM Ag
Pulmoner TB şüpheli kişilerde MTBK ve rifampisine direnci saptamak için ilk tanı testi olarak kullanılan hızlı moleküler testler	
aNAAT, MTBK'yi ve RIF'e direnci saptamak için	• Xpert® MTB/RIF • Xpert MTB/RIF Ultra • Truenat® MTB, MTB Plus and MTB-RIF Dx
Pulmoner TB şüpheli kişilerde MTBK ve rifampisin ile izoniyazid direncini saptamak için ilk tanı testi olarak kullanılan hızlı moleküler testler	
MTBK ve RIF ile INH direncini saptamak için MC-aNAAT	• RealTime MTB ve MTB RIF/INH • BD MAX MDR-TB • FluoroType® MTB ve MTBDR • Cobas® MTB ve MTB-RIF/INH
Anti-TB ilaçlara direnci saptamak için kullanılan geleneksel tanı testleri	
Fenotipik İDT (dolaylı yöntem)	• Katı besi yeri: Löwenstein–Jensen; Middlebrook 7H10 veya 7H11 • Sıvı besi yeri: BACTEC™, MGIT™ 960 TB Sistemi
Bakteriyolojik olarak doğrulanmış akciğer TB'si olan kişilerde anti-TB ilaçlara direnci saptamak için kullanılan hızlı moleküler testler	
FL-LPA: INH ve RIF direncini saptamak için ters hibridizasyon test	• GenoType® MTBDRplus • NTM+MDRTB kit
SL-LPA: florakinolon ve amikasin direnci saptamak için ters hibridizasyon test	• GenoType MTBDRsl test
LC-aNAAT: INH ve ikinci basamak anti-TB ilaçlara (florakinolon, etionamid ve amikasin) direnci saptamak için test	• Xpert MTB/XDR test

HC-rNAAT: Pirazinamid direncini saptamak için test	• Genoscholar™ PZA-TB II test
Dirençli TB araştırmalarında dirençle ilişkili mutasyonları tespit etmek için yeni nesil dizileme (NGS)	
TB enfeksiyonunu tespit etmek için immünolojik testler	
	• Tüberkülin deri testi (TDT)
İnterferon-gamma salınım testi (IGRA)	• T-SPOT.TB, Oxford Immunotec, UK • Quanti FERON-TB Gold Plus (QFT-Plus), Qiagen, USA

FL-LPA: birinci nesil LPA, HC-rNAAT: yüksek karmaşıklıkta ters hibridizasyon NAAT; İDT: ilaç duyarlılık testi, LPA: prob hibridizasyon yöntemi, LC-aNAAT: düşük karmaşıklıkta sahip otomatik NAAT; LF-LAM: Yanal akışlı idrar lipoarabinomannan tahlili, MC-aNAAT: orta karmaşıklıkta otomatik NAAT, NAAT: nükleik asit amplifikasyon testi, SL-LPA: ikinci nesil LPA

Tablo 2.6. DSÖ tarafından onaylanan teknolojiler (81,8).

TB ve/veya ilaç direncinin moleküler tespiti	Kültür tabanlı teknolojiler
• Xpert MTB/RIF, Xpert MTB/RIF Ultra, Cepheid, USA • Xpert MTB/XDR kartuş, Cepheid, USA • GenoType® MTBDR_{plus}, Hain Lifescience/Bruker, Germany • GenoType® MTBDR_{sl}, Hain Lifescience/Bruker, Germany • Genoscholar™ NTM+MDRTB II; Nipro, Japan • TB LAMP, Eiken, Japan • Truenat MTB, MTB Plus and MTB-RIF Dx, Molbio Diagnostics, India • FluoroType MTB ve MTBDR, Hain Lifescience, Germany • Abbott RealTime MTB ve MTB RIF/INH on m2000sp and m2000rt systems, Abbott, USA • BD Max MDR-TB, Becton Dickinson, USA • Roche cobas® MTB and MTB-RIF/INH on Cobas 6800/880 systems, Roche Diagnostics, Switzerland • Genoscholar PZA TB II, Nipro, Japan	Ticari sıvı kültür, İDT sistemleri ve hızlı türleşme
	Mikroskopi Işık ve ışık yayan diyot mikroskopisi (tanı ve tedavi takibi)
	Biyobelirteç tabanlı tahliller Determine TB-LAM Ag, Abbott, USA
	TB enfeksiyonu için interferon gama salınım testleri (IGRA'lar) • T-SPOT.TB, Oxford Immunotec, UK • Quanti FERON-TB Gold Plus (QFT-Plus), Qiagen, USA
	Dijital göğüs radyografisi için bilgisayar destekli tespit (CAD) • CAD4TB v6, Delft Imaging, Netherlands • Lunit INSIGHT CXR (TB algorithm v4.9.0), Lunit, Republic of Korea • qXR v2, qure.ai, India

Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri

Tüberkülozun tanısında kullanılan NAA testleri örnekten veya kültürden basil tespiti için IS6110, IS1081, rpoB, hsp65, devR, mpb64, 16SrRNA, 16S-23S rDNA ITS, sdaA gibi gen bölgelerinin çoğaltılarak tespit edilmesi temeline dayanır (108). Bu testler içerisinde laboratuvar koşullarında tasarlanan polimeraz zincir reaksiyonu (in-house PCR) ilk geliştirilen yöntemdir. Bu testler daha da geliştirilerek gerçek zamanlı PCR, izotermal çoğaltma yöntemleri ve prob hibridizasyon yöntemi gibi teknikleri kullanan, standardize, tekrarlanabilirlik oranı yüksek, otomasyon sistemine sahip birçok ticari NAAT'ler üretilmiştir. Birçoğu eş zamanlı olarak ilaç direnç genlerine de bakabilmektedirler.

Moleküler yöntemler tanıda hızlı, özgüllük ve duyarlılıklarının yüksek olmasına rağmen canlı ve ölü basil ayrımı yapamazlar ve örnek kalitesi, tipi, basil yükü, dağılımı ve kullanılan yöntemin özelliği sonuçlar üzerine etkilidir. Ayrıca birçok örnek tipi inhibitör maddeler içerdiği için yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. Ülkemizde moleküler testlerin kullanım endikasyonu, maliyet hususları da göz önünde tutularak HIV ile ilişkili TB şüpheli hastalar ve apse, beyin omurilik sıvısı gibi zor elde edilen örneklerde klinik tanıyı desteklemek amacı ile sınırlandırılmıştır (7). Bununla beraber DSÖ, TB tanı ve direncinin belirlenmesinde yayma sonucundan bağımsız olarak pulmoner TB şüpheli hastaların tamamında moleküler testleri ilk tanı testi olarak ve sonuçların 48 saat içinde klinisyene bildirilmesini önermiştir (109). Dünya Sağlık Örgütü, bu testleri yüksek tanı doğruluğuna sahip, TB'un ve rifampisin ile izoniyazid direncinin saptanması için orta karmaşıklıkta; otomatik NAAT'ler (Xpert MTB/RIF, Xpert MTB/RIF ultra, Xpert MTB/XDR, Truenat), izoniazid ve ikinci basamak anti-TB ajanlara direncin saptanması için düşük karmaşıklıkta otomatik NAAT'ler (Abbott Real Time MTB, Abbott Real Time MTB RIF/INH, BD MAX MDRTB, Cobas MTB, Cobas MTB-RIF/INH, FlouroType MTBDR, FlouroType MTB), Pirazinamide direncin tespiti için yüksek karmaşıklık hibridizasyon bazlı NAAT'ler (GenoType MTBDRplus V1/V2, GenoType MTBDRsl, Genoscholar NTM+MDRTB II ve Genoscholar PZA-TB II) olarak üç grupta sınıflandırmıştır (87).

Xpert MTB/RIF, Xpert MTB/RIF ultra ve Xpert MTB/XDR

Xpert MTB/RIF testi örneğin doğrudan veya işlenmiş olarak kartuş içerisine yerleştirilmesiyle gerçekleşen bir dizi reaksiyona dayanır. İki saatten daha kısa bir sürede MTBK'yı ve RIF direnciyle ilişkili mutasyonların tespiti için GeneXpert platformunda yarı nested real-time PCR yöntemiyle çalışan otomatik bir testtir. Reaksiyonun kartuş

içinde gerçekleşmesi sonucunda kontaminasyon riski minimaldir. Ayrıca testte balgamı sıvılaştırmak için kullanılan örnek reaktifleri tüberküloidal özelliktedir ve biyogüvenlik konusundaki endişeleri büyük ölçüde ortadan kaldırır. Ancak Xpert MTB/RIF, kesintisiz ve düzenli elektrik güç kaynağı, sıcaklık kontrolü ve cihazın modüllerinin yıllık kalibrasyonunu gerektirir. Xpert Ultra, Xpert MTB/RIF ile aynı cihazı kullanan tanı hassasiyeti ve duyarlılığı artırılmış yeni versiyonudur. Reaksiyon tüp volümü 25 µL'den 50 µL'ye artırılmış, hedeflenen gen bölgelerine çok kopyalı iki yeni gen bölgesi olan IS6110 ve IS1081 eklenmiş, tam nested yöntemine geçilerek geliştirilmiş reaktifler ve enzimler eklenmiştir. Ayrıca daha hızlı termal döngüde sahiptir ve yanlış direnç sonucunu engellemek için analiz eşik döngüsü (Ct) yerine erime ısı (Tm) analizi kullanır. Xpert MTB/RIF için 114 cfu/ml olan tespit sınırına Ultra için 16 cfu/ml dir (87,108,110). Beş binin üstünde örneğin değerlendirildiği 19 farklı çalışmayı içeren bir meta analizde Xpert'in TB tanısında toplu duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla 0,69 (%95 GA: 0,57-0,78) ve 0,99 (%95 GA: 0,98-0,99) olarak tespit edilmiş; Ultra'nın TB tanısında toplu duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla 0,84 (%95 GA: 0,76-0,90) ve 0,97 (%95 GA: 0,96-0,98) olduğu görülmüştür (111). Dünya Sağlık Örgütü, çocuklarda Xpert Ultra'nın dışkı kullanımını sağlamak için ve dışkı numunesi hazırlamayı standart hale getirmek için Optimize Edilmiş Sükroz Yüzdürme yöntemini önermiştir (112). Xpert MTB/XDR test, Xpert MTB/RIF ve Xpert MTB/RIF Ultra'nın çalışıldığı altı rengi algılayabilen GeneXpert cihazında gerçekleştirilen ve farklı olarak 10 rengi algılayan bir GeneXpert cihazı gerektirir. Xpert MTB/XDR test INH, florakinolonlar, etionamid ve ikinci basamak enjekte edilebilir ilaçlara (amikasin, kanamisin ve kapreomisin) karşı direnci tespit etmek amacıyla GeneXpert cihazı için tasarlanmış bir kartuş kullanır. İzoniazid için inhA promoter, katG, fabG1, oxyR-ahpC intergenik bölge; etionamid için inhA promoter; florokinolon için gyrA ve gyrB; amikasin ve kanamisin için rrs, eis promoter; kapreomisin için rrs gen bölgelerini hedef alır. İşlenmemiş balgam örneğinde 136 cfu/ml koloni ve balgam sedimenti için 86 CFU/mL tespit sınırına sahiptir (87,110).

Truenat

Truenat MTB ve MTB Plus testleri, bir saatten kısa sürede doğrudan balgam örneklerinden MTBK tespitini yarı kantitatif, çip bazlı ve gerçek zamanlı mikro PCR kullanarak tespit eder. Taşınabilir bir cihaza sahiptir. Pozitif bir sonuç elde edilirse, ekstrakte edilmiş DNA'nın bir kısmı Truenat MTB-RIF Dx duyarlılık testinde ayrıca çalışılır (87,108).

Abbott Real-Time MTB, Abbott Real-Time MTB RIF/INH

Dünya Sağlık Örgütü tarafından orta karmaşıklıkta otomatik NAAT sınıfına dahil edilen testler MTBK'yı tespit etmek IS6110 genini ve *pab* gen bölgesini hedef alırlar. Rifampisin direnci için *rpoB* gen mutasyonları tespit eden sekiz boya etiketli floresan prob ve INH direnci için *katG* ve *inhA* genlerini tespit eden dört floresan prob kullanır. Test yaklaşık olarak on bir saat içinde sonuçlanır. Test m2000 platformunda, otomatik DNA ekstraksiyonu için kullanılan m2000sp cihazında ve gerçek zamanlı PCR gerçekleştirmek için m2000rt üzerinde gerçekleştirilir. Kültür ve fenotipik İDT ile karşılaştırıldığında TB ve ilaca dirençli TB (DR-TB) tanısı için iyi performans gösterir (87, 89,110).

BD MAX MDR-TB

Dünya Sağlık Örgütü'nün orta karmaşıklıkta otomatik NAAT sınıfına dahil edilen multipleks gerçek-zamanlı PCR yöntemi kullanan test MTBK ve hem RIF hem de INH direncini tespit eder. Basilin tespiti için, IS6110 ve IS1081'in yanı sıra tek kopya *devR* bölgelerini hedefler. Rifampisin direnci için, *rpoB* geni 507–533 bölgesini; INH direnç tespiti için hem *inhA* promoter bölgesini hem de *katG* geninin 315 kodonunu hedef alır. BD Max platformunda DNA'nın otomatik ekstrakte edilerek gerçekleşen PCR testi yaklaşık 4 saat içerisinde cihaz tarafından otomatik olarak sonuçlanıp dijital raporlanır. Test için basil tespit sınırı 0,5 CFU/mL, RIF/INH tespiti için ise 6 CFU/mL'dir (87,89,108).

Cobas MTB, Cobas MTB-RIF/INH

Dünya Sağlık Örgütü testleri orta karmaşıklıkta otomatik NAAT sınıfına dahil etmektedir. Cobas MTB testi, MTBK tespiti için 16S rRNA'yı hem de *esx* genlerini tespit eder. Rifampisin direnci için *rpoB* geni, INH direnci için *inhA* promoter bölgesi ve *katG* genini hedef alır. Testler, gerçek zamanlı PCR için DNA'yı otomatik olarak çıkaran cobas 6800/8800 sistemleri üzerinde yaklaşık 3-3,5 saat içinde sonuçlanır. Testin balgam veya BAL örneklerindeki basil tespit sınırı 7,6-8,8 CFU/mL, RIF direnci için 94-182 CFU/mL; INH direnci için 12,6 CFU/mL-27,5 CFU/mL'dir (87,89,108).

FlouroType MTB (VER 1.0), FlouroType MTBDR (VER 2.0)

Bu testlerden MTBK tespiti için IS6110'u, RIF direnci için *rpoB* genini ve INH direnci için *inhA* promoteri ve *katG* genini hedefler. DNA ekstraksiyonu manuel veya otomatik olarak yapılabilmekteyken, amplifikasyon ve saptama için Bruker-Hain Diagnostics FluoroCycler 12 ve FluoroCycler XT cihazlarını kullanır. Manuel DNA

ekstraksiyonu sonrasında basil tespit sınırı FluoroType MTB’de 15 CFU/mL, FluoroType MTBDR için 9 CFU/mL, RIF/INH direnci tespiti için ise 14 CFU/mL’dir (87, 89,108).

GenoType MTBDRplus ve GenoType MTBDRsl

Ters hibridizasyon ve multipleks PCR yöntemlerini kullanan ilaç direncini de tespit eden DNA şerit bazlı bir test ailesidir. DNA amplifikasyon ürünleri, mutasyonları hedef alan problemlara (MUT problemleri) bağlanıp ya da bağlanmamasına göre değerlendirilir. Tüberküloz ilaç direnci tanısında kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri %90’ın üzerindedir. Dünya Sağlık Örgütü GenoType MTBDRplus’ı yayma pozitif balgam örneği veya kültür pozitif MTBK izolatına sahip kişiler için, RIF ve INH direncini tespit etmek amacıyla fenotipik İDT yerine ilk test olarak; GenoType MTBDRsl’yi ise MDR/RR-TB’si doğrulanmış hastalarda, florakinolon ve amikasin direnci için fenotipik İDT yerine başlangıç testi olarak önermektedir (87,89). GenoType MTBDRplus, rifampisin direnci için *rpoB* problemleri, izoniazid direnci için *katG* problemleri ve *inhA* promotor problemleri kullanır. GenoType MTBDRsl ise *gyrA*, *rrs* gen bölgeleri ve *gyrB* ise *eis* promotor bölgelerini tespit eder (87).

DNA Dizileme Sistemleri

Tüm genom dizileme (WGS) ve yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri ilaca dirençli TB tanısında hızlı ve güvenilir yöntemlerdir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2018 yılında kullanımı ile ilgili ayrıntılı kılavuz yayınlanmıştır (113). Tam gen dizilemede kültürden çalışılırken NGS direk örnekten çalışılabilir. Yeni nesil dizileme testlerinden ilki olan Deeplex® Myc-TB (GenoScreen, Fransa) MTBK suşlarında 48 saatten kısa sürede doğrudan klinik numuneden tür düzeyinde tanımlama, genotipleme ve antibiyotik direncini (15 anti-TB ilaca karşı) aynı anda belirleyebilir. Deeplex® Myc-TB, %3’e kadar TB heterodirencini tespit eder ve ayrıca 100’den fazla mikobakteriyel türün (TDM) yanı sıra TB soylarını ve spoligotiplerini de tanımlar (114). Benzer şekilde geliştirilen NGS temelli testler (TBseq® (ShengTing, Biotech), Next Gen-RDST(Phoenix, ABD), DeepChek-TB RpoB/InhA, NanoTB (Oxford, Büyük Britanya Birleşik Krallığı ve Kuzey İrlanda) mevcuttur (108,114).

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Testi

Dünya Sağlık Örgütü, ticari bir moleküler test olan Loopamp™ (Eiken Chemical Company, Japonya) MTBK tespit kitini önermekle beraber günümüzde birçok başka ticari preparat değerlendirme ve analiz aşamasındadır. Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) reaksiyonu temeline dayanan UV ışığı altında çıplak gözle okunabilen manuel bir testtir. TB-LAMP olarak adlandırılan bu testin sonuçlanması

yaklaşık bir saat kadar sürer. Testte önce numune hazırlama aşamasında bakteriler, inaktivasyon ve parçalanma için ısıtma işlemi tabi tutularak DNA ekstraksiyonunu yapılır. Amplifikasyon aşamasında hedef genin altı bölgesine tamamlayıcı olan dört tip primerle izotermal amplifikasyon 67 °C'de bir ısıtma bloğunda gerçekleştirilir. Son aşamada ise çift zincir DNA boyası içeren test UV ışığı altında çıplak gözle değerlendirilir. Dünya Sağlık Örgütü, bu testi TB ile uyumlu belirti ve semptomları olan erişkinlerde akciğer TB'sini teşhis etmek için balgam yayma mikroskobu yerine önermektedir. TB-LAMP, özellikle akciğer TB'si ile uyumlu belirti ve semptomları olan erişkinlerde balgam yayması negatif numunelerin daha fazla test edilmesi gerektiğinde ve smear mikroskobu için bir takip testi olarak kullanılabilmektedir (87,115).

Yanal Akış İdrar Lipoarabinomannan Testi

İdrarda lipoarabinomannan (LAM) antijeninin saptanmasına dayalı testler, TB için hasta başı test uygulaması olarak ortaya çıkmıştır. Şu anda birçok test kiti, ticari olarak sunulmakla beraber DSÖ'nün mevcut olan analiz ve değerlendirmeleri devam etmektedir. Test aşamasında olan üriner LAM testlerinin hassasiyeti halen yetersizdir ve bu nedenle TB için genel teşhis testleri olarak kullanıma uygun değildir. Bununla birlikte, HIV ile ko-enfekte olan hastalarda TB teşhisi için geliştirilmiş hassasiyete sahiptirler. HIV+ hastalarda yatan hastalarda ölüm oranını %15 oranında azaltırken, TB tedavisine bağlı ayakta tedavi gören hastaların sayısında artış sağlar. Düşük CD4 + TH hücre sayısı olan HIV+ hastalarında duyarlılık daha da fazladır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından onaylanan ilk ve tek hızlı hasta başı TB tanı testi, Alere TB-LAM Ag (Abbott, USA) testi olup idrarda TB hastalığı sırasında metabolik olarak aktif veya dejenere olan bakteri hücrelerinden salınan mikobakteriyel hücre duvarlarında bulunan bir lipopolisakkarit antijen olan Lipoarabinomannan'ı (LAM) saptar. AlereLAM, teste 60 µL idrar uygulanarak ve oda sıcaklığında 25 dakika beklendikten sonra strip üzerinde oluşan bantlar değerlendirilir (87).

2.7. Tüberkülozda Tedavi

2.7.1. Koruyucu Tedavi (Tüberküloz Enfeksiyon Tedavisi)

Tüberküloz tedavisinde enfeksiyon mu hastalık mı ayrımı yapıldıktan sonra karar verilmelidir. Tüberküloz hastalığı olan birine TB önleyici tedavi (kemoproflaksi) önermek, hastalığın iyileşmesini geciktirebilir ve ilaç direncinin ortaya çıkmasını kolaylaştırabilir. Bu nedenle, kemoproflaksiye başlamadan önce TB hastalığını dışlamak

kritik adımlardan biridir. Tüberküloz kemoprofilaksi, TB hastalığının gelişimini önlemek için kanıtlanmış ve etkili bir müdahaledir ve tedavi almayan kişilerle karşılaştırıldığında bu riski yaklaşık %60-90 oranında azaltır (116).

Dünya Sağlık Örgütü, TB önleyici tedaviyi enfeksiyondan TB hastalığına ilerleme riski yüksek olan (HIV ile yaşayan insanlar, silikozis hastaları, anti-TNF tedavisine başlayan veya bu tedaviye hazırlanan hastalar, diyaliz tedavisi gören hastalar ve organ veya hematolojik nakil için hazırlanan hastalar) ve TB hastalığına maruz kalma olasılığı yüksek olan kişilere (bakteriyolojik olarak doğrulanmış TB'si olan kişilerin ev içi temasları, mahkumlar, sağlık çalışanları, yüksek TB yükü olan ülkelerden yeni gelen göçmenler, evsizler ve uyuşturucu kullanan kişiler gibi kurumsal veya kalabalık ortamlarda yaşayan veya çalışan kişiler) önermektedir (116). Latent enfeksiyon tedavi rejimleri ülkemizde; günlük INH ile 6 ya da 9 ay, günlük RİF ile 4 ay, günlük INH ve RİF ile 3 ay, haftalık INH ve rifapentin ile 3 ay alternatiflerinden oluşur. Dünya Sağlık Örgütü bunlara ek olarak 1 aylık günlük INH ve rifapentin rejimini de alternatif olarak önermektedir. On iki yaş ve altı çocuklar için uygun doza ilişkin veri eksikliği nedeniyle bu önerisi için 13 yaş ve üstü hastalar da sınırlamasını getirmektedir (83). İzoniazid ve rifampisin içeren rejimler her yaştan bireyde kullanılabilirle beraber rifapentinin 2 yaş altında kullanımına ilişkin uygun dozu ve güvenliği hakkında yeterli veri olmaması nedeniyle 3 aylık izoniazid ve rifapentin rejiminin yalnızca iki yaş ve üzerindeki çocuklarda kullanılması önerilmektedir (7,83).

En yaygın kullanılan rejim INH ile 6 aylık tedavidir. HIV+ hastalarda yapılan çalışmalarda genel TB riskini %33 ve TDT pozitif olan kişilerde önleyici etkinliğin %64'e kadar ulaştığı gösterilmiştir (117). Bununla birlikte RIF ile kombine daha kısa süreli tedavi rejimlerinde hasta uyumunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Koruyucu tedavi seçiminde, uygun formülasyonların mevcudiyetine ve yaş, güvenlik, ilaç-ilaç etkileşimleri ve bağlılık hususları dikkate alınarak tercih yapılmalıdır.

Ülkemizde çok ilaca dirençli TB ile temastlı olan bağışıklığı baskılanmış veya HIV pozitiflere, 0-5 yaş aralığında olan çocuklara, yüksek riskli veya LTBE varlığında 5 yaş ve üstündeki kişilere kemoprofilaksi başlama endikasyonu vardır. Dünya Sağlık Örgütü, çok ilaca dirençli TB kaynak hasta ve hastanın ilaç direnç paternini belirleyerek temastlılarının IGRA veya TST kullanarak TB enfeksiyonunun belirlenmesini ve koruyucu tedavi verilmesini önermektedir (83). Çoklu ilaç dirençli TB temastlılarında etkili koruyucu tedavi rejimi hakkında randomize kontrollü çalışma olmamakla beraber kaynak hastanın İDT'si dikkate alınır. Kinolon duyarlı olması durumunda,

moksifloksasin ya da levofloksasin 9 ay veya kinolon + etambutol tedavisi önerilmektedir (7,117,118). Bu hastaların tedavi verilip verilmediğine bakılmaksızın, 2 yıl boyunca klinik takibi yapılmalı ve tüberkülozu düşündüren herhangi bir bulgu veya semptom varlığında araştırılarak gerektiğinde küratif rejimlere başlanmalıdır.

Tekrarlanan kemoprofilaksi rejimlerinin faydasına dair bugüne kadar hiçbir kanıt yoktur. Bununla birlikte DSÖ TB bulaşma oranının yüksek olduğu ortamlarda, HIV + kişilerde bilinmeyen veya pozitif bir LTB enfeksiyon testi olan ve aktif TB hastalığına sahip olma olasılığı düşük olan yetişkinler ve ergenler için en az 36 aylık günlük izoniazid önleyici tedavi almasını önermektedir (83).

2.7.2. Tüberküloz Hastalığı Tedavisi

Tüberküloza karşı etkili ilaçların bulunmasından sonra çeşitli tedavi rejimleri ve stratejileri geliştirilmiştir. Ülkemizde TB tedavisinde doğrudan gözetimli tedavi (DGT) uygulanmakta olup kısa süreli standart tedavi rejimlerinin düzenli ve yeterli süre kullanımının sağlanması ilkesine dayanır. Böylece erken bakterisidal aktivite, sterilize edici aktivite ve direnç gelişimini önleyici aktivite sağlanmış olur. Tüberküloz hastalığının tedavisi hastalığın yaygınlığı, tutulan organ çeşitliliği, eşlik eden hastalık varlığı, daha önce tedavi alıp almaması, direnç varlığı ve çocuk-erişkin hasta gibi durumlarda farklılık göstermektedir. Tüberküloz hastası olgu tanımı yapıldıktan sonra uygun tedavi rejimi başlanır. Tedavi rejimleri başlangıç ve idame olmak üzere iki dönemden oluşur. Başlangıç dönemi hızlı çoğalan basillerin temizlendiği dönem olup bakterisidal ve direnç gelişimini önleyici aktivite söz konusudur. Bu dönemde dört temel ilaç kullanılır ve sıklıkla 2 ay sürer. Tedavinin bu dönemde bırakılmasıyla başarısızlık görülebildiği gibi ilaç direnci de gelişebilir. İdame döneminde aralıklarla aktivasyon gösteren, çoğalan basillerin sterilizasyonu gerçekleştirilir. Genellikle 4 ay sürmekle beraber on aya kadar uzatılabilir. Tedavinin bu dönemde bırakılmasıyla tekrar basil ortaya çıktığında genellikle basil ilaçlara duyarlı olur (7).

Ülkemizde tedaviye başlamadan önce her hastadan kültür ve İDT yapılması önerilir. Tedavi başarısızlığında rejim değişikliği ve rejim belirleme İDT önem kazanır. Başlangıçta İDT yapıp yapılmadığına bakılmaksızın bir hastada 3. aydan sonrasında tekrar kültürde üreme olursa, mutlaka yeni bir İDT yapılması önerilir. Takip dışı kalıp dönen ve nüks olgularda tedavi başarısının düşük olması nedeniyle, bu grup hastalara tedavi öncesi hızlı moleküler yöntemlerle RİF ya da İNH + RİF duyarlılığı veya kültür ve fenotipik İDT çalışılması önerilmiştir (7,119). Moleküler olarak RİF direnci tespit

edilirse, birinci ve ikinci seçenек TB ilaçlarına İDT yapılması gerekirken, fenotipik olarak RİF direnci saptanırsa pirazinamide ve ikinci seçenек TB ilaçlarına İDT yapılır (7).

İlaça duyarlı TB tedavisi için 6 aylık tedavi rejiminde dört birinci basamak TB ilacı, yani izoniazid (H), rifampisin (R), etambutol (E) ve pirazinamid (Z) önerilir ve hastaların yaklaşık %85'inde başarılı bir tedavi sonucu ile sonuçlanır. Bu rejimde 2 ay HRZE ve 4 ay HR tedavileri uygun dozda, aralıksız ve DGT ile başlanır. Yeni olgularda ikinci ayın sonunda balgam yaymasında ARB negatif ise idame tedaviye geçilir. Yayma pozitif ise tedavi aynı ilaçlarla bir ay uzatılır. Ek bir aylık tedaviden sonra ARB negatif ise idameye geçilir (118,119,120).

Son yıllarda daha etkili, daha güvenli ilaçların ve daha kısa tedavi rejimlerinin belirlenmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü ilaca duyarlı akciğer TB tanılı 12 yaş ve daha büyük hastalarda 4 aylık izoniazid, rifapentin (P), moksifloksasin (M) ve pirazinamid (2HPMZ/2HPM) rejimi önermektedir (119,121).

HIV+ TB hastalarının, HIV-negatif hastalarla en az aynı süre boyunca tüberküloz tedavisi almaları önerilir. Ayrıca HIV+ hastalarda, CD4+TH hücre sayısına bakılmaksızın, TB tedavisine başladıktan sonraki iki hafta içinde mümkün olan en kısa sürede antiretroviral tedavi başlanmalıdır (7,119).

İlaç yan etki gelişmesi, hastada ilaç intoleransı varlığı, İDT sonuçlarında direnç varlığının görülmesi, ek hastalık varlığında ilaç etkileşiminin olması veya kullanılmakta olan rejimdeki ilaçların temininde zorluklar nedeniyle rejim değişikliğine gidilebilir. Eğer rifampisin kullanılamazsa yerine yerine rifabutin kullanılabilir. Genel durumu bozukluğu, ilerlemiş hastalık, TB menenjit hastalığı, ağır hemoptizi, kontrolsüz diyabet, kronik böbrek, karaciğer hastalığı gibi ek hastalık varlığı ve ilaca bağlı alerji, hepatit gibi yan etkileri olan olgular hastaneye yatırılarak tedavi edilmelidir (122).

2.7.3. Çocuklarda Tedavi

Çocukluklarda TB hastalığı erişkinlerden farklı olarak primer enfeksiyonun bir komplikasyonu olarak gelişir ve daha az sayıda basil içeren kapalı kazeöz lezyonlardan oluşur. Basil yükünün daha az olmasından dolayı çocukluk çağı TB'de sekonder ilaç direnç gelişimi daha azdır ve bağlı olarak tedavi başarısızlığı daha nadirdir. Özel ilaç formülasyonlarının olmamasına bağlı doz sıkıntısı yaşanması, ilaç tatlarının çocuklara yönelik olmaması tedavide güçlük yaratsa da çocuk hastalar erişkinlere göre TB ilaçlarını daha iyi tolere ederler ve ilaç yan etkileri daha az görülmektedir (123). Akciğer ve ağır

olmayan akciğer dışı TB’da başlangıçta INH, R ve Z içeren 3’lü tedavi çocuklarda yeterli olmakla beraber farklı rehberlerde değişik görüşler bildirilmiştir. Amerikan Pediatri Akademisi INH direncinin yüksek olduğu bölgelerde çocuklara 4’lü ampirik TB tedavisi uygulanmasını önermektedir (124). Amerikan Toraks Derneği erişkin tipi TB (üst lob infiltrasyonlu, kaviteli, balgamlı öksürük varlığı) bulguları olan, INH direnç varlığı klinik ve epidemiyolojik olarak yüksek olan hastalara 4 ilaçla tedavi önermektedir (125). Dünya Sağlık Örgütü de 2010 yılındaki çocukluk çağı TB tedavisi ile ilgili güncellemesinde yayma pozitif TB, yaygın parankim infiltrasyonu olan yayma negatif TB ve ciddi akciğer dışı TB hastalarının yanında, izoniyazid direnci yüksek yerlerde yaşayanlarda ve/veya HIV endemik olan bölgelerde başlangıçta 4 ilaçla tedaviyi önermektedir. Dünya Sağlık Örgütü, streptomisini çocuklarda hiçbir tedavi rejiminde birinci seçenek olarak önermemektedir (7,116,118,123).

Üç ay-16 yaş arasındaki şiddetli olmayan TB’lu, yani ÇİD/RR-TB şüphesi veya kanıtı olmayan, hastalarda 4 aylık bir tedavi rejimi (2HRZ(E)/2HR) kullanılmasını önermektedir (119).

Çocuklarda MDR/RR-TB tedavisinde bedakuilin, linezolid ve florokinolonlar kullanılmış olmasına rağmen, pretomanidin kullanımına ilişkin veri yoktur. Bedaquiline artık DSÖ tarafından yetişkinlerde ve her yaştan çocuklarda ÇİD/RR-TB tedavisi için önerilmektedir. Bedaquiline, 18 aylık uzun rejimler yerine 14 yaş altındaki uygun MDR/RR-TB hastaları için tercih edilen tedavi olan 9 aylık tamamen oral rejimin bir bileşeni olarak önermektedir (126). Bununla beraber DSÖ 6 yaşın altındaki MDR/RR-TB olduğu doğrulanmış, ikinci basamak TB ilaçları ile tedaviye maruz kalmamış uygun hastalarda 9-12 aylık süre ile uygulanan bedakuilin içeren tamamen oral bir tedavi rejimi önermektedir (127). Aynı zamanda DSÖ 14 yaş ve üstü MDR/RR-TB’li hastalarda 9 aylık veya daha uzun (18 aylık) rejimler yerine bedakilin, pretomanid, linezolid ve moksifloksasinden (BPALM) oluşan 6 aylık bir tedavi rejiminin kullanılmasını önermektedir (126,127). Dünya Sağlık Örgütü, TB endikasyonu ile onay alan farklı bir sınıf TB ilacı olan delamanid’i erişkin ve her yaş grubu çocuklarda ÇİD/RR-TB tedavisi için önermektedir (128).

2.7.4. Dirençli Hastalarda Tedavi

İlaç direnci giderek yaygınlaşan ve tüberkülozun tedavi başarısını etkileyen büyük bir problemdir. Bu sebeple DSÖ, tüm TB hastaları için uygun tedaviye başlamadan önce TB hastalığını ve birkaç anti-TB ajanına olan direnci saptamak için ilk test olarak

onaylanmış hızlı moleküler testin kullanılmasını önermektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından TB ilk tanı testi olarak önerilen hızlı moleküler testlerin hemen hemen hepsi RIF direncini belirlemekte ve hatta NAAT'lar rifampisin ve izoniazid direncine birlikte bakabilmektedir. Rifampisin, izoniazid ve florokinolonlar için hızlı moleküler testler yaygın olarak mevcut olup etambutol, bedaquiline, klofazimin, linezolid, pretomanid ve delamanid için mevcut değildir. Rifampisin için İDT tüm vakalar için zorunludur. Eğer RIF direnci saptanırsa florokinolonlar için İDT zorunludur. Rifampisin direnci saptanmazsa, Hr-TB'yi tedavi edecek rejimin kullanılması gerekip gerekmediğine karar vermek için INH direnç profili için hızlı moleküler test yapılması önerilir (120).

Dirençli tüberküloz tedavisinde önceleri 20 ay kadar uzun süren tedavi rejimleri kullanılırken yeni çalışmalarla bu süre uygun hastalarda 6 aya kadar kısalmıştır. Bununla beraber önerilen rejimlerde kullanılan ilaçlar için direnç profilinin bilinmesi tedavi başarısının artırılmasında giderek daha kritik hal almaktadır. Dirençli TB tedavisi başlanırken ilaç direnç profili, daha önce TB ilaçlarına maruz kalma ve hasta öyküsü, yakın temasta bulunanların ilaca direnç profili, yaş, akciğer TB hastalığının ağırlığı, akciğer dışı TB lezyonlarının lokalizasyonu ve eşlik eden hastalık göz önünde bulundurulmalıdır. Dünya Sağlık Örgütü, MDR/RR-TB veya pre-XDR olan kanıtlanmış pulmoner TB veya ekstrapulmoner TB (osteoartiküler TB, miliyer TB ve TB menenjit dışındaki) hastalarında florokinolon duyarlı olduğu kanıtlandığı veya varsayıldığı durumlarda tamamen oral ilaç tedavisinden oluşan 6 aylık rejim önermektedir. Ayrıca hastaların hamile olmaması, emzirmemesi, HIV durumuna bakılmaksızın 14 yaş ve üstü olması gerekmektedir. Bedaquilin (B), pretomanid (Pa), linezolid (L) ve moksifloksasin (M) ilaçlarından oluşan BPaLM rejimi hastada florokinolon direnci varsa moksifloksasin atlanılarak BPaL olarak devam edilebilir. BPaLM rejimi 14 yaş altındaki, hamile ve emzirten anneler için uygun değildir. Dünya Sağlık Örgütü, bu hastalar ve florokinolon direnci dışlanmış MDR/RR-TB hastaları için 9 aylık tüm oral ilaçlardan oluşan rejimi önermektedir. Bu rejime göre 6 ay bedaquilin (B) ile birlikte başlanan ve 4 ay sonundaki hastanın balgam yayması değerlendirmesine bağlı olarak 4 veya 6 ay süre ile kullanılması gereken levofloksasin (Lfx) veya moksifloksasin (Mfx), klofazimin (Cfz), etambutol (E) ve pirazinamid (Z), yüksek doz izoniazid (Hh), etambutol (E) tedavileri ile başlanır. Etionamid (E) 2 aylık linezolid ile değiştirilebilir. Sonrasında 5 ay süre ile Lfx veya Mfx, Cfz, E ve Z ile tedavi tamamlanır. Mevcut tedavilerin dışında tedavi cevapsızlığı ve daha geniş ilaç direnç profillerine sahip hasta tedavilerinde en az 18 aylık süre ile uygulanan bireyselleştirilmiş rejimler mevcuttur (120,129).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Turgut Özal Tıp Merkezi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan Malatya İli Tüberküloz Tanı Laboratuvarında 01 Ocak 2018 ile 31 Aralık 2022 tarihleri arasında örnek tipine bağlı olarak dekontamine ve homojenize edilerek işlenmiş, usulüne uygun olarak stoklanmış ve moleküler tanı testleri DSÖ tarafından önerilen PCR kitleri ile çalışılmış 160'ı pozitif ve 82'si negatif olarak raporlanmış 242 adet numune bu çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Numunelerin tamamı, ARB mikroskopik inceleme, TB kültür ve PCR testleri rutin klinik tanı kapsamında yapılmış ve sonuçları raporlanmış örneklerden oluşmaktadır.

Eksi 20 °C'de saklanan numuneler stoktan çıkarılarak tamamı için DNA ekstraksiyonları yapıldıktan sonra Artus® *M. tuberculosis* RG Real-Time PCR kiti ve T11-T12 primerleri kullanılarak In-House PCR yöntemi ile çalışıldı. Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen PCR kiti (Xpert MTB/RIF Ultra) kiti sonuçları referans alınarak iki farklı PCR testi sonuçları karşılaştırıldı. Örnekler, pulmoner ve ekstra pulmoner örnekler olarak sınıflandırıldı.

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu'nun Sağlık Bilimleri Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 26-04-2022 tarih ve 2022/3446 sayılı onayıyla yürütülmüştür.

3.1. Dekontaminasyon Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemi

Laboratuvar kabulü yapılan klinik örneklerden steril vücut örnekleri dekontamine edilmeden; balgam, BAL, trakeal aspirat, açlık mide suyu ve apse sıvısı gibi steril olmayan veya steril şartlarda alınmayan örnekler ise homojenizasyon, dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemine alındı. Klinik örnekler, 50ml'lik konik tabanlı-vidalı kapaklı falkon tüplerinde toplandı. İdrar örnekleri ve steril kabul edilen örnekler için santrifüj sonrası dipte kalan pellet kısmı işlemler için kullanıldı. Doku biyopsi örnekleri steril koşullarda parçalara ayrılarak kullanıldı.

Örneklerin kabulünü takiben pulmoner ve ekstrapulmener örnekler (kan ve BOS örnekleri hariç) işlenene kadar 2-8 °C de bekletildi. Örnekler biyogüvenlik kabin sınıf II'de çalışıldı. Örneklerin dekontaminasyon ve homojenizasyonu NALC-%4NaOH yöntemi ile hazır ticari kit (TDC kiti, RTA Laboratuvarları, Kocaeli) kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler, içinde 5-10 ml N-asetil-L-sistein ve cam boncuklar bulunan 50

ml'lik kapaklı Falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine sodyum hidroksit-trisodyum sitrat çözeltisi 1:1 oranında eklendi. Kapağı sıkıca kapatıldıktan sonra 5–20 sn vorteksenerek homojenizasyon sağlandı. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletildikten sonra üzerine 50 ml tamamlanacak şekilde fosfat tamponu eklendi. Örnekler 16 °C de 3800 devir/dakika hızda 20 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan yaklaşık 30-40 ml süpernatant dikkatlice dezenfektan içeren kaba boşaltıldı. Pellet vorteksle karıştırarak süspansiyon haline getirilerek ortalama 0,1 ml'lik bir kısmı lam üzerine, 0,20 ml'lik kısmı katı kültüre, 1ml'lik kısmı sıvı kültüre ve 2 ml'lik kısmı ise moleküler çalışma için steril ependorf tüpe ayrıldı. Ayrıca stok oluşturmak üzere işlenmiş örnek 2 ml ependorf tüpe alındı. Kısa süre 2-8 °C'de bekletildikten sonra pozitif örnek stokları -20 °C de saklandı. Çalışma alanı ve ekipman 1/ 10 oranında sulandırılmış sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) solüsyonu ile temizlendi.

3.2. Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) Boyama ve Değerlendirme

Kabin içerisinde kurumaya bırakılan lamalar boya yapılacak evyenin üzerine dizildi. Üzerine tüm lamı kaplayacak şekilde karbolfuksin döküldü. Buhar çıkana kadar aralıklı olarak; kuruma ve kaynamaya izin vermeden alttan 3-5 dakika ısıtıldı. Soğuduktan sonra distile suyla yıkandı. Lamin üzerine %3'lük asit alkol dökülerek renk akmayana kadar dekolorize edildi. Su ile yıkanan preparat zıt boya olan metilen mavisi ile 20-30 sn boyanarak tekrar su ile yıkandı. Lamaların alt kısımları kurutma kâğıdı yardımıyla silinerek tamamen kurumak üzere bırakıldı. Her boyamada negatif kontrol *E. coli* ve pozitif kontrol *M. tuberculosis* boyamaya dahil edildi.

Boyalı preparatlar, immersiyon yağı damlatıldıktan sonra 100'lük büyütmede incelendi. Pozitif boyamalarda mikobakteriler mavi zeminde parlak pembe, diğer mikroorganizmalar mavi olarak boyalı olarak görüldü. Basil varlığı en az 300 objektif alanı taranarak araştırıldı. Balgam örneklerindeki basil yükü, **Tablo 2.4.**'te yer alan kriterler gözetilerek tayin edilip raporlandı.

3.3. Löwenstein- Jensen katı kültür yöntemi

Çalışmamızda LJ katı (RTA Laboratuvarları, Türkiye) besiyeri kullanıldı. İşlenmiş örneklerden 0,2 ml alınarak ekim yapıldı. Örnekler hafif dik-yatık bir şekilde 35±2°C'de kapağı kapalı şekilde bir gece bırakıldıktan sonra kapağı gevşetilerek 24 saat etüvde tutuldu ve sekiz hafta boyunca besiyerleri haftada birkaç gün arayla gözle değerlendirilerek üremenin olup-olmadığı incelendi.

3.4. Versa TREK/ESP Kùltür Sistem II

Üretici firma talimatları doğrultusunda, VersaTREK Myco sıvı kùltür şişelerinin kapakları alkolle dezenfekte edildi. İnokùlasyon öncesi şişelere 1ml VersaTREK™ Myco Growth Supplement (Myco GS) ve 0,5ml VersaTREK™ Myco PVNA (Polymyxin B, Vancomycin, Nalidixic Acid, Amphotericin B) eklendi. İşlenmiş örnekten 1 ml inoküle edilerek hastalar tam otomatize Versa TREK/ESP Kùltür Sistem II (TREK Diagnostic Systems,US) cihazına konnektör yardımıyla yerleştirildi ve sekiz haftalık inkübasyona alındı. Bu süreç içinde pozitif bulgu veren örnek şişeleri, anti-mikobakteriyel duyarlılık testi ve tiplendirme işlemine alındı. Çalışılan kùltür yöntemiyle MTBK ve TDM lerede üretilebildiği için pozitif sinyal veren besiyeri şişesi, vortekslelendikten sonra içerisinden 0,1 ml örnek alınarak BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid (Standard Diagnostics, Kore) kart testine damlatıldı. On beş dakika beklendikten sonra tek çizgi gözlemleniyorsa basil TDM, eğer çift çizgiyse MTBK olarak değerlendirildi. Sekiz haftalık inkübasyon sonucunda herhangi bir pozitif bulgu vermeyen şişeler negatif olarak cihazdan çıkarıldı ve ARB boyama ile negatif şişe doğrulandı.

3.5. GeneXpert MTB / RIF Ultra Real-Time PCR Yöntemi

GeneXpert MTB/RIF Ultra testi, GeneXpert® cihazı kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. Konsantrasyon, homojenizasyon ve dekontaminasyon ile işlenen numuneler oda ısısına getirildi. Boş falkon tüpüne 2.1ml Sample Reagent ve 0,7ml işlenmiş örnek eklenerek süspanse edildi ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Numuneler, inkübasyon sırasında iki kez vorteksle hafifçe karıştırıldı ve ardından test kartuşuna 2,1 ml köpük oluşumu engellenerek aktarıldı. Sonuçlar otomatik cihazdan okunarak elde edildi.

3.6. DNA ekstraksiyonu

Örnek türüne uygun olarak homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemi uygulanmış ve -20°C saklanmış olan numuneler biyogüvenlik sınıf II kabine alındı ve oda ısısına gelmesi beklendi. Daha sonra birkaç saniye vortekslenip yeniden homojenize edildi. Bulaştırıcılık riskini ortadan kaldırmak ve DNA eldesini kolaylaştırmak için izolasyon öncesi ısıtma işlemine tabi tutularak basil hücre duvarının hasarlandırılması sağlandı. İşlenmiş örnekten 500µl alınarak vidalı 2ml lik ependorf tüpüne alındı. Üzerine 200µl G2 buffer ve 50µl lizozim (20mg/ml, SigmaAldrich, ABD) eklenerek kısa vortex yapıldı ve karışım 37°C de 1 saat inkübe edildi. Takibinde 30µl

Proteinase K (600 mAU/ml) eklenerek 56°C 1 saat bekletildi. Son olarak 95°C'de 15 dakika bekletilip soğumaya bırakıldı. Daha sonra kapakları açılarak silika bazlı manyetik parçacık teknolojisiyle çalışan QIAasymphony SP (Qiagen, Almanya) otomatize izolasyon cihazına yerleştirildi. DSP Virus/pathogen Midi Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak basilin DNA'sı otomatize olarak elde edildi ve PCR işlemi için kullanılabilecek kadar -20°C saklandı.

3.7. Artus® MTB-RG kiti ile PCR çalışması

Gerçek zamanlı PCR için Artus MTB-RG PCR Kiti -20 °C'deki soğutucudan çıkarılarak oda ısısına gelmesi sağlandı. Her kullanımdan önce tüm reaktiflerin tamamen çözünmesi için bekledi, hızlı vorteksleme ile karıştırıldı ve kısa süre santrifüj edildi. İlk seferde 64 adet örnek, 2 adet pozitif ve 1 adet negatif kontrol örneğine ait PCR tüpü önceden 2-8°C'de bekletilmiş soğuk bloğa yerleştirildi. PCR karışım hazırlamak için her hasta için RG Master'dan 13µl, RG Mg-SO₄'dan 2µl ve RG IC'den 2µl olarak toplam volüm hesaplandı. Soğutma bloğu üzerindeki 0,1 ml'lik PCR tüplerine her bir tüpe 15 µl olacak şekilde master mix dağıtılarak her bir tüpe hasta örneklerinden elde edilen DNA solüsyonundan 10µl eklendi. Pozitif kontrol olarak kantitasyon standartları *M. tuberculosis* RG QS-2 ve 3'ten 10µl ve negatif kontrol olarak 10µl su (PCR sınıfı dH₂O) kullanıldı. PCR tüplerini kapatılarak kilitleme halkası ile birlikte Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) real-time PCR cihazının rotorunun üstüne yerleştirildi ve amplifikasyon işlemi başlatıldı. Program bitiminde sonuçlar yorumlanırken iç kontrol floresan ışımaları değerlendirildi. İç kontroller beklenen ışımayı yapmış ise; floresans kanalı Cycling Green içinde bir sinyal saptanmışsa pozitif, Cycling Green içinde sinyal saptanmamış aynı zamanda Cycling Yellow kanalında dahili kontrolden bir sinyal belirdi ise negatif kabul edildi.

3.8. In-House PCR Çalışması

3.8.1. Mikobakteriler Spesifik Hsp65 Bölgesinin PCR İle Çoğaltılması

Bu amaçla mikobakterilerin ortak 65 kDa'luk ısı şok proteinini (Heat Shock Protein 65; HSP65) kodlayan gen bölgesi hedef olarak seçildi. Hasta örneklerine ait ekstrakte DNA örnekleri -20 °C'den çıkarıldı ve oda ısısına gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra hedef bölgeye spesifik **TB11** (5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3')

ve **TB12** (5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3') primerleri ile **Tablo 3.1**'de gösterilen solüsyonlar kullanılarak PCR miksi oluşturuldu.

Tablo 3.1. In-House PCR işleminde kullanılan maddelerin miktar ve konsantrasyonu

Solüsyon	Miktar
Distile su	30.75 µl
PCR buffer (10x)	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer 1 (TB11, 10 pmo/µl)	2.5 µl
Primer 2 (TB12, 10 pmo/µl)	2.5 µl
Taq polimeraz (5U/µl)	0.25 µl
Örnek DNA	5 µl
Toplam	50 µl

Soğutma bloğu üzerinde 2 ml'lik tüplerde TB11 2,5µl, TB 12 2,5µl, 10X PCR buffer 5 µl, MgCl₂ 3 µl, dNTP 1µl, H₂O 30,75µl ve Taq polimeraz 0,25 µl toplamda her bir örnek için karışım 45 µl olacak şekilde örnek sayısının çarpımı kadar hazırlandı. Örnek numaraları yazılmış 0,2 ml'lik ependorf tüplere dağıtıldı. Üzerlerine ekstraksiyon işlemi sonrası elde edilen DNA'lardan 5 µl eklendi. Optimizasyon çalışması yapılarak uygun şartlarda bantların net görüntülenmesi sağlayan **Tablo 3.2**'de gösterilen koşullarda GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) ısı döngü cihazında amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. Hsp65 gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu için reaksiyon şartları

Reaksiyon Aşamaları	Isı (0C)	Süre (dk)	Siklus Sayısı
Denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	
Bağlanma	57	1	40
Uzama	72	2	
Final Uzaman	72	8	1

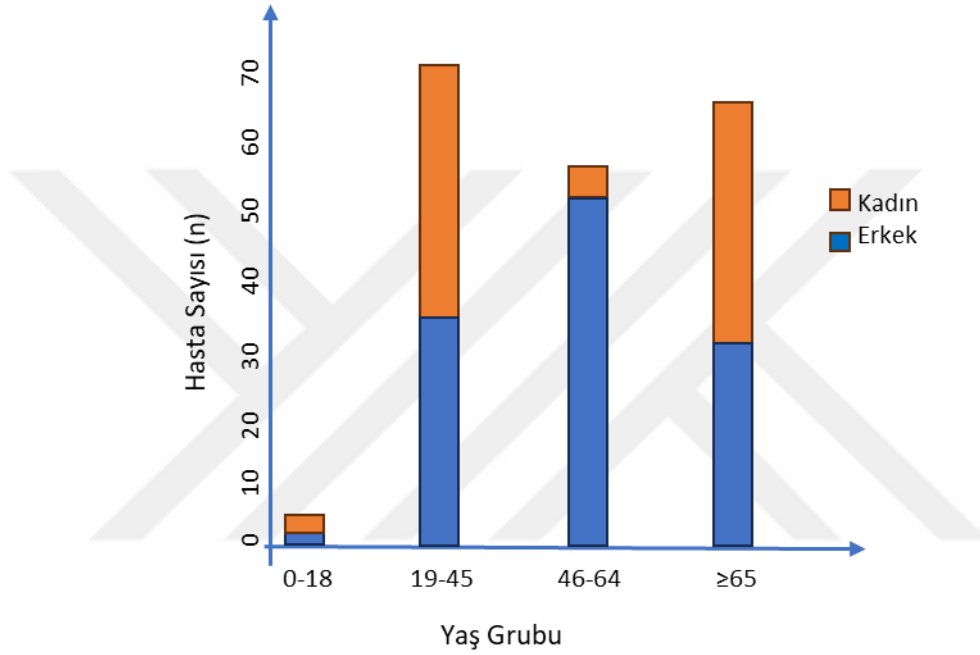
3.8.2. Jel Elektroforezi ve PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Elde edilen PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jel hazırlamak için 2.25 gram (gr) moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya) hassa tartı ile tartılarak 150 ml 1X TBE (Tris, Borik asit, EDTA) içerisine eklenip beher ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak mikrodalga fırına yerleştirildi. Kaynatılmadan sık sık kontrol edilerek

4. BULGULAR

Çalışmaya toplam 202 hastaya ait 242 örnek dahil edildi. Hastaların 115'i (%56,93) erkek ve 87'si (%43,06) kadındı. Hastaların ortalama yaşı 51,5 ve ortanca yaşı 54 (min=1, max=93) yıl idi. Hastaların yaş büyüklük sıralamasında çeyrekler açıklığı indeks (Inter Quantile Range; IQR) değeri 28,5 yıl idi.

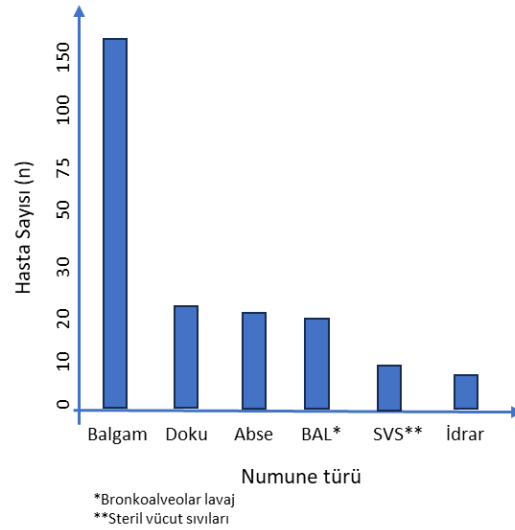
Hastaların yaş ve cinsiyet özellikleri Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmaya alınan numunelerin ait olduğu 202 hastanın yaş ve cinsiyet özelliklerine göre dağılımı

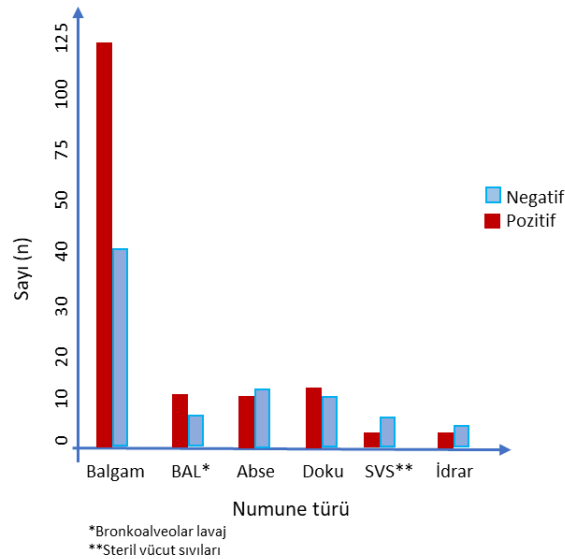
Çalışmaya alınan örneklerin 163'ü (%67,35) balgam, 23'ü (%9,5) doku, 21'i (%8,67) abse, 19'u (%7,85) bronşiyal lavaj sıvısı, 9'u (%3,71) BOS, plevral aspirat, peritoneal aspirat gibi steril vücut sıvıları ve 7'si (%2,89) idrar numunelerinden oluşmaktaydı.

Çalışmaya katılan örneklerin tür dağılımları Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



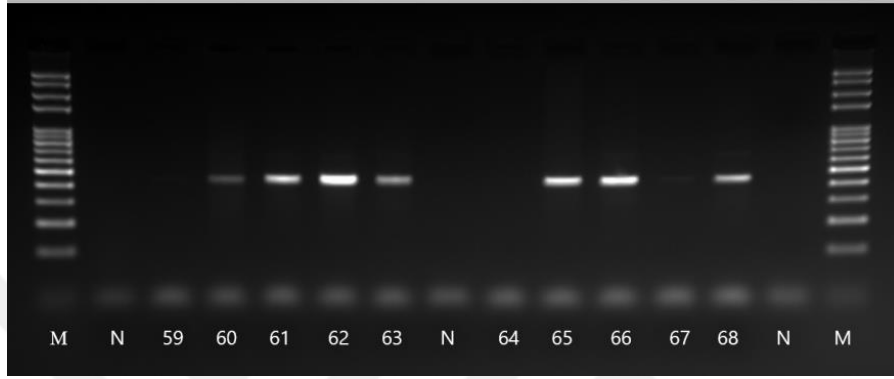
Şekil 4.2. Çalışmaya alınan 242 klinik numunenin örnek türüne göre sayısal dağılımları

Çalışmaya alınan örneklerin 94'ü (%38,84) GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile pozitif, 71'i (%29,33) düşük pozitif ve 77'si (%31,81) negatif olarak saptandı. PCR-pozitif toplam 165 örneğin 123'ü (%74,54) balgam, 13'ü (%7,87) BAL, 13'ü (%7,87) doku, 10'u (%6,06) abse, 3'ü (%1,81) steril vücut sıvısı ve 3'ü (%1,81) idrardı. PCR-negatif 77 örneğin 40'ı (%51,94) balgam, 11'i (%14,28) abse, 10'u (%12,98) doku, 6'sı (%7,79) BAL, 6'sı (%7,79) steril vücut sıvısı ve 4'ü (%5,19) idrardı. Çalışmaya alınan örneklerin GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile saptanan pozitiflik ve negatiflik özelliğine göre numune tür dağılımları **Şekil 4.3**'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Çalışmaya alınan 242 örneğin GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile saptanmış pozitif ve negatif olma özelliğine göre numune tür dağılımları

Çalışılan örnekler içinde GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile pozitif olarak saptanmış 94 örneğin 74'ünde T11-T12 primerleri ile yapılan in-house PCR ve 82 örneğin Artus real-time PCR testi pozitif olarak sonuçlandı. Buna göre in-house ve ticari real-time kitlerinin DSÖ tarafından önerilen GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile pozitif örnekleri saptamadaki uyumu sırasıyla %78,72 ve %87,23 olarak bulundu. **Şekil 4.4**'te 59-68 örneklere ait T11-12 primerleri ile yapılmış örnek jel elektroforez görüntüsü görülmektedir.



Şekil 4.4. 59-68 numaralı örneklere ait In-house PCR jel elektroforez görüntüleri

Çalışılan örnekler içinde GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile düşük pozitif olarak saptanmış 71 örneğin 44'ünde T11-T12 primerleri ile yapılan in-house PCR ve 41 örneğin Artus real-time PCR testi pozitif olarak sonuçlandı. Buna göre in-house ve ticari real-time kitlerinin DSÖ tarafından önerilen GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile düşük pozitif örnekleri saptamadaki uyumu sırasıyla %61,97 ve %57,74 olarak bulundu.

Çalışılan örnekler içinde GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile negatif olarak saptanmış 77 örneğin 74'ünde T11-T12 primerleri ile yapılan in-house PCR ve 76 örneğin Artus real-time PCR testi negatif olarak sonuçlandı. Buna göre in-house ve ticari real-time kitlerinin DSÖ tarafından önerilen GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile negatif örnekleri saptamadaki uyumu sırasıyla %96,10 ve %98,70 olarak bulundu.

Çalışılan PCR testlerinin pozitif ve negatif örnekleri saptama uyumları **Tablo 4.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışılan in-house ve real-time PCR yöntemlerinin GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti sonuçları ile uyumu. T11-T12 In-House PCR

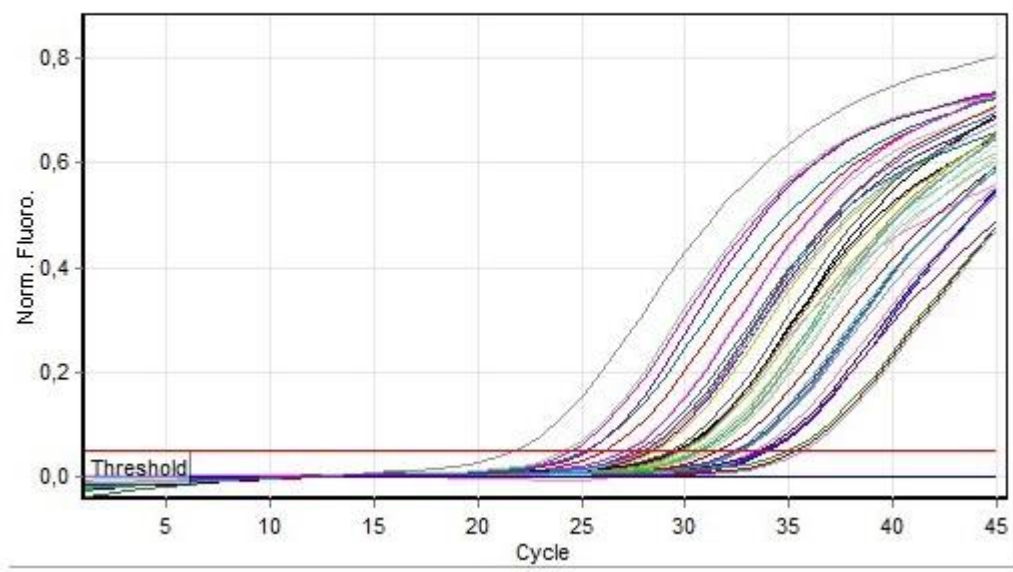
	Yöntem Uyumu (%)	
	T11-T12 In-House PCR	Artus Real- Time PCR
GeneXpert MTB		
Pozitif	78,72	87,23
Düşük Pozitif	61,97	57,74
Negatif	96,10	98,70

Çalışılan örneklerde DSÖ tarafından önerilen GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti tarafından negatif olarak sonuçlanmış bir örneğin TB kültüründe MTBK üremesi olduğundan ve bir diğer negatif örneğin ait olduğu hastanın iki ay içinde TB tanısı almış olması ve bu hastaya ait örneğin çalışmamızda Artus kiti ile MTBK yönünden pozitif saptanması nedeniyle toplam iki negatif örnek TB-pozitif olarak kabul edilip incelenen PCR yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük ve prediktif değerleri hesaplandı. Buna göre, T11-T12 primerleri ile yapılan in-house PCR'ın duyarlılığı %71,25 ve özgüllüğü %97,33 olarak saptandı. T11-T12 primerleri sadece MTBK suşlarına özgü olmadığı ve genel olarak mikobakterileri saptadığı için bu testin pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplama dışı bırakıldı. Artus real-time PCR kitinin örneklerde bulunan MTBK suşlarını saptama duyarlılığı %74,25, özgüllüğü %99,40, pozitif prediktif değeri (PPD) %74,25 ve negatif prediktif değeri (NPD) %64,10 olarak saptandı. **Şekil 4.5'**te 1-51 numaralı örneklere ait artus kiti sonuçları ve Ct değerleri **Şekil 4.6'** da ise aynı örneklerin grafipleri görülmektedir.

Channels  Cycling A.Green  Cycling A.Yellow  Cycling B.Green										
No.	C	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (cop	Calc Conc (copie	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Stc
1		1	Unknown	33,59					33,59	
2		2	Unknown	32,99					32,99	
3		3	Unknown	32,92					32,92	
4		4	Unknown	32,63					32,63	
5		5	Unknown		NEG (NTC)					
6		6	Unknown		NEG (NTC)					
7		7	Unknown	34,10					34,10	
8		8	Unknown		NEG (NTC)					
9		9	Unknown	29,71					29,71	
10		10	Unknown	32,60					32,60	
11		11	Unknown		NEG (NTC)					
12		12	Unknown		NEG (NTC)					
13		13	Unknown	28,37					28,37	
14		14	Unknown	25,80					25,80	
15		15	Unknown	24,60					24,60	
16		16	Unknown	30,32					30,32	
17		17	Unknown	27,17					27,17	
18		18	Unknown	24,40					24,40	
19		19	Unknown	34,74					34,74	
20		20	Unknown	22,07					22,07	
21		21	Unknown		NEG (NTC)					
22		22	Unknown	27,19					27,19	
23		23	Unknown	35,20					35,20	
24		24	Unknown	39,10					39,10	
25		25	Unknown	29,59					29,59	
26		26	Unknown		NEG (NTC)					
27		27	Unknown	24,64					24,64	
28		28	Unknown		NEG (NTC)					
29		29	Unknown	27,24					27,24	
30		30	Unknown	34,91					34,91	
31		31	Unknown	28,24					28,24	
32		32	Unknown	29,99					29,99	
33		33	Unknown		NEG (NTC)					
34		34	Unknown	27,55					27,55	
35		35	Unknown	30,14					30,14	
36		36	Unknown	24,44					24,44	
37		37	Unknown	24,38					24,38	
38		38	Unknown	27,71					27,71	
39		39	Unknown	34,32					34,32	
40		40	Unknown	25,22					25,22	
41		41	Unknown	25,95					25,95	
42		42	Unknown	24,52					24,52	
43		43	Unknown	32,85					32,85	
44		44	Unknown	23,90					23,90	
45		45	Unknown	23,40					23,40	
46		46	Unknown	25,87					25,87	
47		47	Unknown	25,83					25,83	
48		48	Unknown	27,60					27,60	
49		49	Unknown	28,33					28,33	
50		50	Unknown	30,12					30,12	
51		51	Unknown	27,31					27,31	

Şekil 4.5. 1-51 numaralı örneklere ait Artus® MTB-PCR kiti ile PCR çalışma sonuçları

Quantitation data for Cycling A.Green



Şekil 4.6. 1-51 numaralı örneklerle ait Artus® MTB-PCR kiti eğrileri

Çalışılan PCR testlerinin duyarlılık, özgüllük ve prediktif değerler gibi tanısal performans sonuçları **Tablo 4.2**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışılan PCR testlerinin duyarlılık, özgüllük ve prediktif değerler gibi tanısal performans sonuçları

PCR Testleri	Tanısal Performans Değerleri (%)			
	Duyarlılık	Özgüllük	PPD*	NPD**
GeneXpert MTB***	98,80	97,40	98,80	97,40
T11-T12 PCR	71,25	97,33	-	-
Artus Real-Time PCR	74,25	99,40	74,25	64,10

*PPD: pozitif prediktif değer, ***NPD: negatif prediktif değer.

***TB kültürü ile beraber referans tanı yöntemi olarak değerlendirmeye alınmıştır.

Çalışılan örneklerin 163'ü balgam ve 19'u bronşiyal lavaj sıvısı olduğundan pulmoner örnek sayısı 182 (%75,20) ve geri kalan 60'ı (%24,79) ise akciğer dışı örnekler idi. Buna göre çalışılan in-house ve real-time PCR testlerinin ekstra-pulmoner örneklerde DSÖ tarafından önerilen GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti ile pozitif örnekleri saptama uyumu sırasıyla %66,66 ve %81,27 olarak; negatif örnekleri saptama uyumu ise her iki PCR yöntemi için %100 olarak bulundu. Çalışılan in-house ve real-time PCR testlerinin pulmoner örneklerde DSÖ tarafından önerilen GeneXpert MTB/RIF Ultra

PCR kiti ile pozitif örnekleri saptama uyumu sırasıyla %78,98 ve %77,53 olarak; negatif örnekleri saptama uyumu ise sırasıyla %93,18 ve %97,72 olarak bulundu. Çalışılan in-house ve real-time PCR testlerinin pulmoner ve ekstra-pulmoner örneklerde elde edilen sonuçlarının DSÖ tarafından önerilen GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kitine ait sonuçlarla uyumu **Tablo 4.3**'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Çalışılan PCR testlerinin pulmoner ve ekstra-pulmoner örneklerde GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR ile uyumu.

		Yöntem Uyumu (%)			
		T11-T12 In-House PCR		Artus Real-Time PCR	
		P*	EP**	P*	EP**
GeneXpert MTB					
	Pozitif	78.98	66.66	77.53	81.48
	Negatif	93.18	100	97.72	100

*P: pulmoner, **EP: ekstra-pulmoner.

5. TARTIŞMA

Modern tıptaki tüm gelişmelere rağmen TB halen tanısı en zor yapılan enfeksiyon hastalıklarındandır. Bu tanısal zorluğa neden olan faktörler dört ana başlık altında özetlenebilir. Bunlar; patojene özgü nedenler, hasta kaynaklı, hastayı değerlendiren hekim kaynaklı ve laboratuvar testleri kaynaklı nedenlerdir.

Patojen kaynaklı nedenlere bakıldığında; MTBK'nın üreme-çoğalma, sahip olduğu virülans faktörleri, kullandığı metabolik yollar ve konak immün sistemi ile çok yönlü olarak etkileşim gösterebilmesi onu eşsiz bir bakteriyel patojen haline getirdiği görülmektedir. Ancak bu eşsiz özellikler onun saptanmasına pozitif yönde değil olumsuz olarak katkı sunan özelliklerdir. *Mycobacterium tuberculosis*, dış ortam koşullarına uzun süre dayanabilen, dezenfeksiyon yöntemlerine ve enfeksiyon kontrol önlemlerine görece olarak daha dirençli ve bilinen en yavaş bölünme hızına sahip bir insan patojenidir. Temelde solunum yolu ile yayılım göstermekle birlikte kontamine gıdalar ve diğer bazı yollarla da canlılar arasında bulaş gösterebilir. Akciğer dokusuna ulaştığında onunla ilk etkileşime giren makrofajlar basili fagosite edip intraselüler sindirim mekanizmalarını başlatmasına rağmen bakteriyi genellikle sindiremezler ve basilin makrofaj içindeki hayat süreci başlar. Bu nedenle, TB'nin oluşabilmesi için tek bir basilin alveolar dokuya ulaşması yeterlidir. İmmün sistemi başarılı bir şekilde düzenleyebilmesi sonucunda basile karşı çoğunlukla onu sınırlandırıcı bir cevap üretilir (130,131). Bu esnada basil metabolizmasını yavaşlatarak bölünmeyi durdurabilmekte ve ileride immün sistemde oluşan herhangi bir zafiyet sonucunda yeniden aktivasyon gösterebilmektedir. Bu durum patojeni kazanmış bireylerde yıllar boyu süren, sessiz, bazen çok belirsiz semptomlarla ilerleyen sinsi bir klinik tablo oluşumuna yol açar. Ayrıca, kişinin immün sistemi yeterince iyi işlev görmeye başlarsa enfeksiyon yeniden sınırlandırılır ve semptomlarda hafifleme/kaybolma izlenir. İşte bu iki durum birçok hastanın tıbbi yardıma başvurusunu azaltıcı etki oluşturur.

Tüberküloz klinik olarak birçok hastalığı taklit edebilen ve kendine özgü olmayan semptomlara yol açtığından bu hastaların klinik olarak değerlendirilmesinde birçok hastalığın göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Klinik özelliklerin böylesi geniş bir yelpazede ortaya çıkması uzun bir tıbbi değerlendirme ve farklı tanı algoritmalarının uygulanmasını gerekli kılar. Bu uzun tanı sürecinde özellikle semptomlarda oluşabilecek gerilemeler, hastanın tıbbi tanı sürecini tamamlamamasına yol açabilecek bir etki gösterir.

Hastayı değerlendiren hekimin TB hakkındaki mesleki deneyimi hastaların doğru tanınmasında oldukça önemli bir kriter olup (33) TB'a özgü laboratuvar testleri yapılmadığı sürece hastalığın genel tıbbi tetkiklerle tanısını yapmak çoğu zaman mümkün olmayacaktır. Tüm bu nedenlerden dolayı TB hastaları birçok kez tıbbi yardıma başvursa da TB testleri yapılmadığı sürece hastalık tam olarak anlaşılmamaktadır. Buraya kadar anlatılan basile, hastaya ve hastayı değerlendiren hekimin bilgi ve deneyimine bağlı kritik etkilerin çokluğu nedeniyle toplumdaki TB hastalarının en az 1/3'ünün tanı alamadığı öngörülmekte ve bu tür sorunların çözülmediği sürece TB'un "sessiz katil" olarak varlığını devam ettireceği kabul edilmektedir (1,30,31). Bu amaçla DSÖ tarafından her yıl dünyada yaklaşık 3 milyon TB hastasına ulaşamadığı öngörülmekte bunların tanı ve tedaviye ulaşımını sağlamak için stratejiler yayınlamaktadır (132).

Tüberkülozun tanısının oldukça güç oluştunda laboratuvar testlerinden kaynaklanan birçok etki rol oynamaktadır. Öncelikle; TB tanısının yapılabileceği laboratuvarlar özellikle biyogüvenlik düzeyi yükseltilmiş, özel mimariye ve uygun teknik ve fiziki altyapıya sahip olarak yapılandırılırlar. Bu nedenle, tüm tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında TB tanı testleri yapılmamaktadır. Ayrıca, TB laboratuvarında çalışan personelin özellikle bu testleri yapmak için uzun ve zorlu bir eğitimi tamamlamış olması ve uygulamada belli bir deneyim kazanmış olması gerekir. Tüberküloz laboratuvarlarının bu tür temel fakat zor karşılanabilir gereksinimleri, TB tanı olanaklarının özellikle kaynakları sınırlı ülkelerde kurulmasını, yeterli kaynakları olan ülkelerde de tüm yerleşim alanlarına kazandırılmasını engelleyen önemli bir handikap olmuştur. Toplumda yaygın fakat belirsiz klinik özellikler gösteren; diğer taraftan doğru tanı için özel mikrobiyolojik analizlere son derece bağımlı olan TB gibi bir hastalığın teşhisinde tüm dünyada yaşanan en büyük sorun yeterli tanı laboratuvarının olmaması veya yaygın bulunmaması olarak görülebilir.

Basilin kendine özgü niteliklerinden dolayı, genel bakteriyolojik kültür ve gram boyalı mikroskopi ile saptanamadığından bu amaçla özel test tekniklerinin uygulanmasına gereksinim vardır. Bunlardan aside dirençli boyama ile yapılan mikroskopinin duyarlılığı en ideal koşullarda dahi %65 dolayında olup (104,109) akciğer dışı örneklerde veya örnekteki basil sayısı belirgin düzeyde az olduğu durumlarda bu değer %20'lerin altına düşmektedir (133). Diğer taraftan, TB tanısında günümüzdeki altın standart yöntem olarak uygulanan TB kültürü, ARB mikroskopi gibi, öncesinde yine çok iyi bir örnek hazırlık süreci gerektirmekte ve besiyeri inokülasyonu sonrası sekiz haftalık bir inkübasyon sürecine ihtiyaç duymaktadır. Modern tıptaki gelişmeler otomatize kültür

sistemlerini kullanıma sunmuş olmasına karşın birkaç gün gibi kısa sürede sonuçlanan bir TB kültür yöntemi halen bulunmamaktadır. Ayrıca kültür, klinik örnekte belli bir düzeyde aktif olarak çoğalan basil gerektirdiğinden latent TB tanısı, basil atılımının az olduğu durumlar ve özellikle akciğer dışı tutulumlarda belirgin düzeyde yanlış negatif sonuçlar artmaktadır. Tüberkülozun laboratuvar tanısında kullanılan bu tür klasik yöntemlere ait kısıtlılıklar, yani tanı yöntemlerinin TB tanısına uyarlanmasında önemli bir itici güç olmuştur. Seksenli yıllardan itibaren PCR ve son 30 yıl içinde önemli ilerleme kaydedilen genom dizileme analizleri bunların tipik örnekleri olarak görülebilir.

Moleküler bir tanı yöntemi olarak PCR birkaç saat içinde sonuçlanması ve kabul edilir bir duyarlılık ve özgüllük değeri sunması nedeniyle TB tanısında son 30 yıldır kullanılmaktadır. Buna karşın bu yöntemin moleküler mikrobiyolojik analizlerde iyi düzeyde deneyim kazanmış personele ve bu testler için özel yapılandırılmış bir laboratuvara gereksinim göstermektedir. Ayrıca, bu testlerdeki hızlı gelişime karşın sarf malzemeleri ve kimyasallarının yüksek düzey teknoloji gerektirmesinden dolayı halen moleküler testlerdeki yüksek maliyet sorunu devam etmektedir. Moleküler analizlerde basilin DNA molekülü hedef alındığından ölü basili veya aktif olmayan bir enfeksiyonu pozitif olarak saptanmış olması bir taraftan avantaj olsa da diğer taraftan klinisyenin tanı kargaşasına neden olma riskini de beraberinde getirmektedir. Ancak yine de klasik tanı yöntemlerinde yukarıda anlatılan sorunlar nedeniyle günümüzde MTBK, PCR'ın tanı amacıyla en fazla kullanıldığı bakteriyel patojen durumundadır.

Moleküler mikrobiyolojik teknolojide sağlanan gelişmelerle PCR'ın gerçek zamanlı (real-time) modifikasyonları geliştirilmiş; genom ekstraksiyonunda da sağlanan ilerlemeler tüm tanı sürecini birkaç saatlik bir süreye indirilebilmiştir. Aynı anda onlarca hastanın TB-PCR testinin yapılabilir hale gelmesi hasta yükü yüksek olan laboratuvarların işini kolaylaştırmış ve bu alanda belirgin bir hız kazandırmıştır. Daha sonraki gelişmelerle, real-time PCR platformlarında basile özgü DNA bölgesi ile bilinen direnç genlerinin de saptanabildiği multipleks real-time PCR kitleri geliştirilmiştir. Bu kitlerin çoğunlukla kapalı sistemler olması ve her bir numune için bir kartuş harcaması nedeniyle TB'nin moleküler analizlerinde karşılaşılan en sık sorun olan laboratuvar içi kontaminasyon (çapraz kontaminasyon) sorununu da neredeyse giderilmiş durumdadır. Bu tür kitler DSÖ tarafından belirli aralıklarla test edilmeye başlanmış ve 2010 sonrası bu kurum tarafından onaylanan testlerin rutin TB tanısı içinde kullanımı önerilmeye başlanmıştır (87,106). Günümüze kadar 10 farklı kit bu anlamda DSÖ tarafından TB tanısı için onaylanarak tavsiye edilir hale gelmiştir (81). Ancak bu kitlerin sadece kendine

özgün cihazda çalışması, çalışma için özel yazılım gerektirmesi ve her bir kit ile ancak bir hasta numunesi çalışılması gibi nedenlerden dolayı önemli bir maliyet sorunu bulunmaktadır. Uluslararası medikal pazarda bu tür kitlerin tanesi 20-30 USD civarında satılmakta olup bu rakam yüzbinlerce TB hastası düşünüldüğünde önemli bir kaynak sorununu da beraberinde getirmiştir. Örneğin ülkemizde yıllık 850 bin ila 1 milyon civarı TB tanı testi yapıldığı dikkate alınırsa (41), sadece bu testin ülkemizin sağlık ekonomisine maliyeti 30 milyon USD civarına kadar yükselmektedir. Diğer taraftan, TB'nin yaygın olarak bulunduğu ve dolayısı ile dünyadaki TB vakalarının rezervuarı durumunda bulunan gelişmemiş ülkeler için bu maliyet düzeyi karşılanamaz bir gider olarak ortaya çıktığından DSÖ-onaylı kitlerin kullanımında karşılaşılan maliyet sorunu tüm dünyada kendisini gösteren bir problem durumundadır.

Moleküler yöntemlerin TB tanısında sağladığı hız ve yüksek etkinlik gibi çok önemli avantajlardan mahrum kalmaksızın daha ucuz ve kullanımı kolay PCR kitlerine olan gereksinim yukarıda ifade edilen nedenlerden dolayı tüm dünyada gittikçe artmaktadır. Diğer taraftan, moleküler teknolojilerde devam edegelen gelişmeler sonucunda maliyeti daha düşük kitler üretilmiş ve termal döngü cihazlarının yazılımsal ve saptama teknolojilerinde mütemadiyen ilerleme sağlanmıştır. Bu gelişimler de göz önüne alındığında sağlık piyasasında bulunan TB-PCR kitlerinin düzenli aralıklarla test edilerek bu yöntemlerin rutin tanıda uygulanabilirliği, avantajlı ve dezavantajlı olduğu hususların saptanmasına gereksinim doğmaktadır. Bu yaklaşım, ülkemizde ve tüm dünyada TB gibi önemli bir sağlık sorunun etkin tanısına katkı sunabilecek ve sağlık ekonomilerine önemli bir fayda sağlama olanağı sunacaktır.

Bu çalışmada, DSÖ-onaylı TB-PCR kitine karşı etkinliği değerlendirilen ilk PCR yöntemi, T11-T12 primerlerinin kullanıldığı in-house PCR yaklaşımı olmuştur. Bu primerler, mikobakterilerin Hsp65 olarak tanımlanan önemli bir antijenik proteini kodlayan ortak gen bölgesi hedef alınarak geliştirilmiş olduğundan sadece MTBK değil aynı zamanda atipik mikobakterileri de saptama özelliği bulunmaktadır. Bu durum, T11-T12 PCR'ın atipik mikobakteri/MTBK ayrımı yapamaması gibi bir dezavantajı beraberinde getirir de sadece MTBK'yı tarayan PCR yöntemlerinin tüm atipik TB hastalarını sistematik olarak atlama engelleyen bir avantaj durumundadır. Özellikle HIV(+) kişilerin veya başka nedenle immün-baskılanmış hale gelmiş hastaların toplumlarda arttığı düşünüldüğünde atipik TB hastalarının etkin olarak saptanmasının önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Sonuçta, bu primerlerin kullanıldığı in-house PCR testinin pozitif olması durumunda laboratuvarlarda birkaç ek işlem gerçekleştirilerek

MTBK/atipik ayrımını yapılması gerekirken klinisyenin de hastanın göstermiş olduğu bazı atipik TB bulgularını göz önüne almasını sağlayabilecektir. T11-T12 primerlerinin kullanıldığı in-house PCR yöntemi 30 yılı aşkın bir süredir kullanılmakta olup bu alanda başarısını ispat etmiş en basit moleküler yaklaşım olması ile TB tanısında vazgeçilmez bir moleküler analiz yaklaşımı halindedir. Ayrıca, DNA özütleme, ısı döngü cihazlarının mütemadiyen geliştirilmesi ve kullanılan amplifikasyon enzimlerinin artan kalitesi gibi etkilerin bu yönteme nasıl yansıdığının anlaşılması da incelemeye değer önemli bir husustur.

Çalışmamızda T11-T12 primerlerinin kullanıldığı in-house PCR yöntemi toplam 167 TB-pozitif hastanın 119'unu (%71,25) ve 75 TB-negatif hastanın 73'ünü (%97,33) doğru olarak saptamıştır. Bu test, karşılaştırılan diğer iki PCR yönteminin negatif olarak sonuçlandığı; ancak, mikobakteri kültürü pozitif olan bir TB hastasını saptayan tek moleküler analiz yöntemi olarak görülmüştür. T11-T12 PCR, diğer tüm TB testleri negatif olarak sonuçlanmış iki hastada pozitif olarak sonuçlanmıştır ki bu hastaların örneklerinde atipik mikobakteri varlığına işaret etmektedir. Tüberküloz tanı laboratuvarlarına gönderilen örneklerin ait olduğu hastalarda önemli düzeyde bir TB şüphesi olduğu göz önüne alındığında tüm standart TB testleri negatif olduğunda, klinisyenin atipik etkenlerden de uzaklaşarak başka olası hastalıkların tanısına yöneleceği ve böylelikle olası bir atipik TB hastasını atlayacağı dikkate alındığında bu veri klinik olarak hekimin dikkatine mutlaka sunulması gereken bir husus olarak anlaşılmaktadır. Bu iki önemli hasta dışlandığında, T11-T12 primerlerinin kullanıldığı in-house yönteminin TB-negatif hastaları saptama düzeyi mükemmel (%100) olarak sonuçlanmıştır. Bu durum, daha önceki dönemlerde özellikle laboratuvar içi çapraz bulaşlar neticesinde oluşan yanlış pozitiflik sorunun artık görülmediği gibi önemli bir bulguyu da gözler önüne sermektedir.

Çalışmamızda kullanılan T11-T12 PCR yönteminin TB hastalarını tespit etmedeki etkinliği hakkında yapılmış birçok çalışma vardır. Vanda ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 247 adet örnek çalışılmış ve 2 tanesinde kültür pozitif buldukları 19 örnekte T11-T12 PCR amplifikasyonu sağlanmış ve yöntemin %25 PPV ve %97,5 NPV verdiği bildirilmiştir. Vanda ve arkadaşlarının çalışmasında bu yöntem için bilindiren duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla %25 ve %97,5 düzeyinde olmuştur (134). Mandira ve arkadaşları 167 pulmoner tüberkülozlu olan hasta numunesinde 128 tanesini (%76,6) T11-12 PCR ile uyumlu bulmuştur (135). Diğer bir çalışmada Lopez ve arkadaşları 105 adet klinik örnek çalışmış, sırasıyla duyarlılık ve özgüllüğü %61,5 ve %87,4 bulmuştur

(136). Bu veriler bizim bulduğumuz verilerle karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda T11-T12 PCR'ın pozitifleri saptamada daha yüksek bir etkinlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Ancak, bu yöntemin özellikle manuel PCR işlemlerin hazırlanmasında önemli bir deneyim gerektiriyor olması ve ayrıca benzer deneyim düzeyinin TB örneklerinin homojenizasyon-dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemlerinde de bulunması gerektiğinden laboratuvarlar arası farklılıkların oluşabileceği akılda bulundurulmalıdır. Bizim bu çalışmayı gerçekleştirdiğimiz laboratuvarın moleküler mikrobiyolojik analizler yönüyle önemli bir geçmişi, oldukça iyi teknik donanımı ve yüksek bir deneyimi olması gibi hususlar elde ettiğimiz bu yüksek duyarlılık ve özgüllük değerlerinde göz önüne alınması gereken yöntemden bağımsız bir etki oluşturabilir.

T11-T12 primerleri ile yapılan analizlerde örneğin türüne bağlı olarak duyarlılıkta önemli değişim olduğu görülmektedir. Pulmoner örneklerde, referans yöntemle in-house PCR'ın pozitifleri saptama uyumu yaklaşık %79 iken ekstra-pulmoner örneklerde bu uyumun 2/3'e düştüğü görülmektedir. Bu durum, basil sayısının görece olarak daha yüksek olduğu akciğer örneklerine kıyasla basil sayısının daha az olduğu akciğer dışı örneklerde in-house PCR'ın önemli düzeyde bir duyarlılık kaybına uğradığını göstermiştir. Bu sonuç, çalışmamızda T11-T12 primerle yapılan in-house PCR için bahsedilmesi gereken en önemli tanısal yetersizliği oluşturmaktadır. Diğer taraftan örnek türüne göre özgüllük değerlerinin %94 ila %100 arasında bulunmuş olması altı çizilmesi gereken önemli bir pozitif bulgu olmuştur.

Çalışmamızda incelenen ikinci PCR kiti, bir ticari ürün olarak medikal piyasada bulunan Artus real-time PCR yöntemi olmuştur. Bu kitin seçilmesinde markadan bağımsız hareket edilerek sadece ülkemizde değil uluslararası planda eldesi kolaylıkla gerçekleştirilebilen, markadan bağımsız olarak farklı real-time termal döngü cihazlarında çalışılabilen ve belli bir tanısal performans değeri sunabiliyor olması nedeniyle TB'un moleküler tanısında kullanılabilirliği kanıtlanmış olması gibi özellikler göz önüne alınmıştır. Böylelikle çalışmamızdan elde edilecek verilerin uluslararası bilimsel literatüre olan katkısının artırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan Artus real-time TB PCR kiti, MTBK türlerinin genomunda yer alan 159 bp bölgenin spesifik amplifikasyonu sağlayarak nükleik asit ekstraksiyonu sonrası yaklaşık 2 saatte sonuçlanmaktadır. Bu kitle ayrıca, oluşan gerçek zamanlı amplifikasyon grafiklerinin birkaç dakikada yorumlanması ile pozitif ve negatif örnekler ayırt edebilmekte, kullanılan pozitif ve negatif kontroller ile reaksiyonunun doğru gerçekleşip-gerçekleşmediği gösterilebilmekte ve kullanılan iç (internal)

kontrolleri yardımıyla her bir reaksiyon tüpünde amplifikasyon kalitesi izlenebilmektedir. Bu özellikleri yönüyle T11-T12 primerlerinin kullanıldığı in-house PCR yöntemine göre daha az işlem gerektiren, sadece iki basamaklı bir iş akışı ile kısa sürede sonuçlanabilen ve sonuçların yorumlanmasında objektif veriler sağlayabilen bir PCR yöntemi olması nedeniyle daha avantajlı bir metot durumundadır. Ayrıca, T11-T12 in-house PCR sonucunda jeldeki bantların görüntülenebilmesi için EtBr gibi karsinojen bir asidin kullanımını gerektirmemesi yönüyle de hem kullanıcı hem de çevre dostu bir yöntem olma hüviyetindedir.

Çalışmamızda, DSÖ-onaylı yöntemin pozitif olarak saptadığı örneklerin yaklaşık dörtte üçü Artus PCR kiti ile yapılan PCR testinde pozitif bulunmuştur. Bu değer; DSÖ-onaylı kitin “düşük pozitif” olarak sonuçlandığı örneklerde %58 gibi düşük bir düzeye inse de DSÖ-onaylı PCR’ın “pozitif” olarak sonuçlandığı örneklerde %90’a yaklaşmıştır.

Diğer taraftan DSÖ-onaylı PCR kitinin “negatif” olarak sonuçlandığı örneklerde Artus PCR kiti mükemmele yakın bir tanı özgülüğü göstermiştir. Bu durum Artus kitinde çapraz kontaminasyon riskinin çok iyi düzeyde minimize edilerek neredeyse DSÖ-onaylı kit ile aynı düzeye getirilmiş olduğuna işaret etmektedir. Oysaki DSÖ-onaylı kit, TB tanısında önemli bir sorun olan bu tür kontaminasyonları engellemek amacıyla kapalı bir sistem olarak yapılandırılmış ve her bir numune için tek kit kartuşu tüketimi geliştirilmiş bir PCR platformu hüviyetindedir. Artus kitinin; DSÖ-onaylı kitin “düşük pozitif” veya “pozitif” olarak sonuçlandığı örneklerde göstermiş olduğu bu önemli duyarlılık farkının, örnekteki basil yoğunluğu ile ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Buna karşın çalışmamızda göreceli olarak düşük basil yükü bulundurması olası olan akciğer dışı örneklerde Artus real-time kitinin %80’in üzerinde bir pozitif yakalama duyarlılığı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar bize, DSÖ-onaylı kitin “düşük pozitif” olarak sonuçlandığı örneklerde, -numune türünden bağımsız olarak-, belirgin düzeyde düşük basil varlığı olduğunu; bu basillerin saptanmasında T11-T12 PCR’ın önemli düzeyde duyarlılık kaybı gösterirken bu düzeydeki basil varlığının saptanmasında Artus PCR kitinin başarılı sayılabilecek bir performans sağlayabildiğini göstermektedir. Dolayısı ile ekstrapulmoner örnekler için Artus real-time PCR kitinin kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Çalışmamızda ayrıca, Artus real-time PCR kiti, DSÖ-onaylı PCR kitinin negatif olarak sonuçlandığı bir hastada pozitif olarak sonuçlanmıştır. Bu hastanın özelliklerine bakıldığında, bir ay önce hastanın TB tanısı almış olduğu görüldüğünden Artus kitinin vermiş olduğu bu pozitifliğin gerçek bir hastalığı yansıtan doğru bir saptama

olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle MTBK saptanmasında Artus kitinin DSÖ-onaylı kitin negatif verdiği hastaların çapraz kontrolü içinde kullanılabileceği görülmektedir.

Artus real-time TB PCR kiti yapılan çalışmalarda yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü hakkında farklı sonuçlar bildirilmiştir. Gülnur ve arkadaşlarının Artus TB PCR ile yaptığı bir çalışmada, 1104'ü akciğer kaynaklı, 810 akciğer dışı toplam 1914 adet klinik örnek çalışılmış ve bunlardan, 39'u gerçek pozitif, 1801'i gerçek negatif, 39'u yalancı pozitif 35'i yalancı negatif saptanmıştır. Bu yöntem için bilindiren AC kaynaklı ve AC dışı örnekler için duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla %50-55 ve %97 olarak hesaplanmıştır (137). Diğer bir çalışmada Abdulmajed ve ark. 32 kültür pozitif, 18 kültür negatif 50 adet örnekle çalışmış ve bunlardan 29'u Artus PCR kiti ile pozitif bulunmuştur. Kültürle karşılaştırıldığında duyarlılık %72, özgüllük %56, negatif prediktif değer %66 ve pozitif prediktif değer %62 olarak belirlenmiştir (138). Kültürün altın standart kabul edildiği, 432 örneğin çalışıldığı başka bir çalışmada ise Artus PCR kiti'nin duyarlılık %44,9 özgüllüğü ise %99,1 bulunmuştur (139). Bu veriler bizim bulduğumuz verilerle karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda Artus real-time PCR'ın pozitifleri saptamada daha yüksek bir etkinlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Ancak, bu yöntemin özellikle manuel PCR işlemlerinin hazırlanmasında önemli bir deneyim gerektiriyor olması ve ayrıca benzer deneyim düzeyinin TB örneklerinin homojenizasyon-dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemlerinde de bulunması gerektiğinden laboratuvarlar arası farklılıkların oluşabileceği akılda bulundurulmalıdır. Bizim bu çalışmayı gerçekleştirdiğimiz laboratuvarın moleküler mikrobiyolojik analizler yönüyle önemli bir geçmişi, oldukça iyi teknik donanımı ve yüksek bir deneyimi olması gibi hususlar elde ettiğimiz bu yüksek duyarlılık ve özgüllük değerlerinde göz önüne alınması gereken yöntemden bağımsız bir etki oluşturabilir.

Dünya sağlık örgütü tarafından da erişkin ve çocuklarda TB tanısında ve rifampisin direncinin belirlenmesinde ilk tanı testleri olarak önerilen Xpert MTB/RIF ve Xpert MTB/RIF Ultra kitleri, örnekten direk çalışılabilme imkânı sağlayan hızlı ve güvenilirliği çalışmalarla da ispatlanmış yöntemlerdir. Xpert MTB/RIF kitinin çocuklarda, HIV pozitif hastalarda ve ekstrapulmoner örneklerdeki hassasiyetindeki eksiklik ve bazı rifampisin direncinden sorumlu mutasyonların tespit edilememesi gibi sınırlamaları daha ileri bir jenerasyon test olan Xpert MTB/RIF ultra testi ile giderilmiştir. Yöntemin; örneklerdeki daha az sayıdaki basil tespit edilebilirken özgüllüğünde düşüş olmuştur. Bu durum yanlış pozitifliğe neden olabilecek eser pozitif olarak adlandırılan sonuçların yorumlanmasında klinisyene zorluk oluşturmaktadır. Xpert MTB/RIF kitinin

pulmoner örneklerdeki duyarlılığı kültür altın standart yöntem olarak alındığında yayma pozitif hastalarda %95'lere kadar çıkarken yayma negatif örneklerde % 48-90 gibi değişen değerlerde olup genel olarak özgüllüğü %97-100 arasındadır. Ekstrapulmoner örneklerde ise duyarlılığı %40'ların altına düşmektedir (140). Bununla beraber Xpert MTB/RIF Ultra kitinin AC TB'lu erişkin hastalarda duyarlılığı %86 civarında iken özgüllüğü %96 gibi çok yüksek düzeydedir (141). Bizimde laboratuvarımızda rutin TB tanısında yıllardır kullanmakta olduğumuz Xpert MTB/RIF Ultra kiti çalışmamızda kültürle beraber altın standart yöntem olarak alınmasına neden olmuştur.

Xpert Ultra kiti tanısal verimliliğinin çok yüksek olması, rifampisin direnci de dahil sonuçların saatler içerisinde ulaşılabilir olması, tüm reaksiyonun çapraz bulaşı engelleyecek nitelikte tek bir kapalı kartuşta gerçekleşerek laboratuvar güvenliğinin sağlanması gibi avantajlara sahipken bu sistemin kurulması ve devamlılığının sağlanması laboratuvar maliyetlerinin artmasına sebep olmaktadır. Bu durum maliyet etkin, hızlı sonuçlanan, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek moleküler testlerin özellikle de çalışmamızda olduğu gibi çoklu yöntem performanslarının değerlendirildiği karşılaştırmalı analizleri içeren çalışmalara gerekliliği artırmaktadır.

Çalışmamızda örneklerde DSÖ tarafından önerilen GeneXpert MTB/RIF Ultra PCR kiti tarafından negatif olarak sonuçlanmış bir örneğin TB kültüründe MTBK üremesi olmuş, diğer bir negatif örneğin ise ait olduğu hastada iki ay içinde TB tanısı konmuştur. Ayrıca bu hastaya ait örnek çalışmamızda Artus kiti ile MTBK yönünden pozitif saptanmıştır. GeneXpert MTB ultra test için duyarlılığımız %98,80, özgüllüğümüz ise %97,40 olarak bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüberküloz, tüm dünyada halen önemli bir sağlık sorunu olma özelliğini devam ettirmekte ve yıllık 1,5 milyondan fazla insanın hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Hastalığın göstermiş olduğu belirsiz klinik tablolar ve kısıtlı laboratuvar desteği; TB hastalarının doğru tanı almasında geciktirici etki göstermektedir. Tüberkülozu tespit edebilen tanı testlerinin sadece bu amaçla tasarlanmış kapsamlı laboratuvarlarda yapılıyor olması hem klinik hem laboratuvar tanısının önündeki diğer önemli bir handikap durumundadır.

Son yıllarda moleküler mikrobiyolojik yöntemlerdeki hızlı gelişmeler, bu tür analiz yöntemlerini kullanabilen laboratuvarların yaygınlaşmasına katkı sunmuş ve moleküler testler TB tanısında önemli bir yer edinmiştir. Kültür ve mikroskopi gibi klasik tanı yöntemlerinin düşük duyarlılığı, zahmetli olması ve çok uzun süre gerektirmesine karşın moleküler analiz yöntemlerinin oldukça yüksek duyarlılık ve özgüllüğü ve aynı gün içinde sonuçlanabiliyor olmaları ile TB tanısında dikkate değer bir avantaj sağlanmıştır.

Bu nedenle, DSÖ tarafından bu tür testler, sundukları tanısal performans değerleri bakımından belli aralıklarla analiz edilmekte ve başarılı bulunanların rutin tanıda kullanımı önerilmektedir. İki bin on yılından sonra bu şekilde DSÖ-onaylı kitlerin hem kullanım alanı ve hem de tıbbi tanı piyasasındaki ağırlığı önemli ölçüde artmıştır. Fakat buna karşın; bu kitlerin yüksek maliyeti, onların rutin tanıda devamlı surette kullanılmaları sağlamak için oldukça yüksek mali kaynak gerektirmektedir. Bu nedenle, her yıl daha da fazla geliştirilmekte olan alternatif PCR yöntemlerinin DSÖ-onaylı kitlerle karşılaştırılması, farklı kullanım amaçları için farklı alternatif test yöntemlerinin belirlenmesine katkı sunacak bir yaklaşım durumundadır. Dolayısı ile bu çalışma yukarıda açıklanan bu amaç doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre;

1. Çalışmamızda kullandığımız ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından onaylanan PCR kiti halen tüm TB hastalarını saptayamamaktadır. Çalışmamıza dahil ettiğimiz iki TB hastası DSÖ-onaylı kit ile negatif olarak bulunmuştur. Bu hastalardan birinde, DSÖ-onaylı PCR'ın çalışıldığı bir klinik örneğin yapılan TB kültürü pozitif olarak sonuçlanmıştır. Kültür-pozitif numunede bu PCR kitinin negatif sonuçlanması halen TB kültürünün altın standart tanı yöntemi

olarak devam ettirilmesinin ne denli doğru bir yaklaşım olduğunun bir diğer kanıtıdır. Dolayısı ile TB'un moleküler tanı alanında halen önemli gelişmelere olan gereksinim devam etmektedir.

2. Çalışmamızda kullandığımız T11-T12 in-house PCR kiti pozitif örneklerin %71'inden fazlasını ve negatif örneklerin %100'ünü doğru saptamıştır. Bu durum, laboratuvar içi çapraz kontaminasyon gibi TB'nin in-house PCR ile saptanmasında karşılaşılan en önemli sorunun uygun laboratuvar ve deneyimli personel varlığında ortadan kaldırılabileceğinin bir bulgusu durumundadır. Pozitif hastaları saptamada in-house PCR yöntemi, akciğer dışı örnekler ve düşük basil varlığı olan akciğer örneklerinde %60 dolayında bir duyarlılık gösterirken basil miktarının görece olarak daha fazla olabileceği diğer olası durumlarda pozitifleri saptamada %80'e yaklaşan bir duyarlılık sunmaktadır. Bu yöntemin sadece MTBK suşlarını değil aynı zamanda insanda hastalık oluşturabilecek atipik mikobakterileri de saptaması, bu tür patojenler yönüyle risk altındaki popülasyonun toplumlarda arttığı da göz önüne alındığında bu yöntemin en önemli avantajı durumunda görülebilir. Nitekim çalışmamızda iki hastada atipik mikobakteri saptanmış olup klinisyenin böylesi bir enfeksiyonu düşünmesi durumunda tanıya önemli bir veri kazandırılmıştır.

Bu testin örnek başına 1 USD gibi oluşan gideri, altı çizilmesi gereken diğer en önemli avantajı olup yöntemin yaygın kullanımında toplam maliyet hususuna önemli katkı sunabilecek bir özellik durumundadır.

3. Çalışmamızda kullanılan real-time PCR kitinin özgüllüğü mükemmel düzeyde, duyarlılığı ise %80'e yakın olarak bulunmuştur. Bu tanısal performans değerleri göz önüne alındığında, böylesi bir PCR kitinin rutin TB tanısında kullanılabilirliği anlaşılmaktadır. Ancak laboratuvar mimarisi ve altyapısında moleküler testlere özgü düzenlemelere ve alanda deneyimli personele olan gereksinim karşılanması gereken önemli hususlar olarak belirlemektedir.

Bu testin örnek başına 10 USD gibi oluşan gideri; DSÖ-onaylı kitin bunun iki ila üç katı olması gibi bir gerçeğe karşılaştırıldığında önemli mali katkı sağlayabilecek bir yaklaşım olması yönüyle de önemli bir kullanılabilirlik avantajı sağlamıştır.

4. Bu iki alternatif metot birlikte değerlendirildiğinde, TB'un rutin moleküler analizinde real-time platformun daha fazla olmak üzere her iki PCR

yönteminin DSÖ-onaylı PCR kitine karşı etkenin tanısında alternatif olabileceği görülmektedir. Ancak her iki yöntem ilaç direnci gibi bir özelliği halen saptayamadığından DSÖ-onaylı kit bu anlamda rakipsiz olma özelliğini devam ettirmiştir. Bu anlamda alternatif yöntemlerin geliştirilmesine olan ihtiyaç süregelmektedir.

5. Tüm verilerimiz göz önüne alındığında; Dünya Sağlık Örgütü tarafından onaylı PCR kitinin hastanın ilk tanısında kullanılabileceği; TB tanısı konulmuş ve ilaç duyarlılığı saptanmış hastaların kontrol örneklerinde ise in-house PCR veya real-time PCR'ın takip amaçlı kullanımının uygun olabileceği ve böylelikle önemli bir mali tasarruf sağlanabileceği anlaşılmaktadır. Yine özellikle atipik etkenlerin neden olduğu bir TB tablosu düşünülüyorsa DSÖ-onaylı kit öncesinde T11-T12 kitinin kullanılmasının daha uygun olacağı görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. <https://www.who.int/tools/digital-resources-for-tuberculosis/> erişim: 01.07.2023
3. https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1 erişim: 01.07.2023
4. Winn W, Allen S, Janda W. Mycobacteria. Konemans'color atlas and textbook of diagnostic microbiology 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and wilkins. 2006; 19: 1064-1507
5. Mycobacterium tuberculosis kompleks ve rifampisin direncinin saptanmasında hızlı moleküler yöntemle konvansiyonel yöntemlerin karşılaştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020;50(1):10-20
6. YAMAN G, Parlak M, DEMİROL M, Guducuoglu H, BERKTAŞ M (2012). Çeşitli klinik örneklerin EZN boyama ve tüberküloz kültür sonuçlarının değerlendirilmesi. ORTADOĞU TIP DERGİSİ, 4(1), 19-22.
7. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi, 2. Baskı, Ankara, Mayıs 2019, ISBN: 978-975-590-717-8, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 1129. Özkarataş, E., Özkarataş, M. H., Özkütük, A. A., & Esen, N. (2020).
8. Practical manual on tuberculosis laboratory strengthening, 2022 update. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
9. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organization; 2020
10. Wei Z, Zhang X, Wei C, Yao L, Li Y, Zhang X, Xu H, Jia Y, Guo R, Wu Y, Yang K, Gao X. Diagnostic accuracy of in-house real-time PCR assay for Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis. 2019 Aug 8;19(1):701. doi: 10.1186/s12879-019-4273-z. PMID: 31395014; PMCID: PMC6686366.
11. Barış Yİ. (2011). Dünyada Tüberküloz'un Tarihi. Konuralp Medical Journal, 3 (2),1-4

12. Keskinbora K. Savaşta Düşmanlardan Bir Diğeri: Tüberküloz. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi. 2016; 6(3): 174-184
13. Worbus M.” Captain of all these men of death”. The History of Tuberculosis in Nineteent. Bulletin of The History of medicine, 2004, 78 (2): 489-490
14. Galagan, J. Genomic insights into tuberculosis. Nat Rev Genet 15, 307–320 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrg3664>
15. Gerszten E, Allison MJ, Maguire B. 2012. Paleopathology in South American mummies: a review and new findings. Pathobiology 79:247–256. <https://doi.org/10.1159/000334087>..
16. Nikiforuk, A. (2013). Mahşerin dördüncü atlısı: Salgın ve bulaşıcı hastalıklar tarihi. (Çev. S. Erkanlı). İstanbul: İletişim Yayıncılık. (Özgün çalışma 1991).
17. Armocida, E., & Martini, M. (2020). Tuberculosis: a timeless challenge for medicine. Journal of preventive medicine and hygiene, 61(2), E143–E147. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.2.1402>
18. Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., & Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. Journal of preventive medicine and hygiene, 58(1), E9–E12.
19. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-319-41995-4_553 erişim: 26.07.2023
20. https://en.wikipedia.org/wiki/Robert_Koch erişim tarihi: 26.07.2023
21. Tüberküloz Tarihçesi DOI :10.26650/AB/AA08.2022.162 İhsan Rifat Sabar
22. Daniel T. M. (2006). The history of tuberculosis. Respiratory medicine, 100(11), 1862–1870.
23. Barış Yİ. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun, 2003
24. Fındık S. Yetişkinlerde Tüberküloz Tedavisi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun, 2003.

25. Billur, D. (2020). İstanbul'da Bulaşıcı Hastalık Tarihinden Kesitler: Şahsiyetler, İmgeler ve Mekânlar Üzerinden Bir İnceleme. MSGSÜ Sosyal Bilimler, 2 (22) , 218-237. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/msgsusbd/issue/69526/1107272>
26. Osmanlı'da Tüberküloz. Y. İzzettin Barış. Author Affiliation(s). 1. Güven Hastanesi, Ankara. Thorac Res Pract 2002; 3: Toraks Dergisi 335-337.
27. Özyardımcı N, Gürses AH. Yurdumuzda ve Dünyada Verem Savaşı ve Düşündürdükleri, Bursa, 2004.
28. Donoghue H. D. (2016). Paleomicrobiology of Human Tuberculosis. Microbiology spectrum,4(4),10.1128/microbiolspec.PoH-0003-2014.
29. Buzic, I., & Giuffra, V. (2020). The paleopathological evidence on the origins of human tuberculosis: a review. Journal of preventive medicine and hygiene, 61(1 Suppl 1), E3–E8. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.1s1.1379>.
30. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
31. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
32. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/tb-disease-burden/2-1-tb-incidence>
33. Yakupogullari Y, Ermis H, Kazgan Z, Otlı B, Bayindir Y, Gulbas G, Tanriverdi E, Guldogan E. Diagnostic and treatment outcomes of patients with pulmonary tuberculosis in the first year of COVID-19 pandemic. East Mediterr Health J. 2022 Sep 29;28(9):682-689. doi: 10.26719/emhj.22.060.
34. Avcı M, Etiz P. COVID-19'un Tüberküloz Üzerindeki Etkileri. J TOGU Heal Sci. 2023;3(2):246-257
35. <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021/research-innovation>. Erişim tarihi: 05/07/2023
36. Implementing the end TB strategy: the essentials, 2022 update. Geneva:World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
37. https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_pronto/

38. https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22EN%22&iso2=%22TR%22 erişim05/07/2023,
39. https://worldhealthorg.shinyapps.io/TBrief/?_inputs_&sidebarCollapsed=true&entity_type=%22country%22&iso2=%22TR%22&sidebarItemExpanded=null erişim05/07/2023
40. <https://hsgmdestek.saglik.gov.tr/tr/tuberkuloz-istatistikler> erişim tarihi: 05/07/2023
41. Türkiye'de verem savaş 2020 raporu ISBN: 978-975-590-821-2 Sağlık Bakanlığı Yayın No: 1205. Ankara – 2021
42. AKTAŞ ve Ark., Tüberkülozda Ülkemiz Verilerine Güncel Bir Bakış. Sakarya Tıp Dergisi 2022;12(3):586-595
43. KARA Ş, ASLAN D (2021). Küreselleşen Dünyada Tüberküloz: Halk Sağlığı Bakış Açısıyla Güncel Durum Değerlendirmeleri. Sağlık ve Toplum, 31(1), 3 – 22
44. https://worldhealthorg.shinyapps.io/TBrief/?_inputs_&sidebarCollapsed=true&entity_type=%22country%22&iso2=%22TR%22&sidebarItemExpanded=null
45. WHO Global Tuberculosis Programme. (1994). TB : a global emergency, WHO report on the TB epidemic. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/58749>
46. Unknown author (1993). Tuberculosis: a global emergency [full issue]. World health 1993;46(4):3-31 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/52639>.
47. 2030 Yılına Kadar Tüberkülozu Sona Erdirme Sürecini Hızlandırmak İçin Çok Sektörlü Sorumluluk Çerçevesi, Dünya Sağlık Örgütü Yayını”, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 1194; Ankara; 2021. ISBN: 978-975-590-802-1
48. The Global Plan to End TB 2023-2030: Copyright © 2022 by the Stop TB Partnership: Global Health Campus Chemin du Pommier 40, 1218 Le Grand-Saconnex, Geneva, Switzerland
49. <https://www.stoptb.org/advocacy-and-communications/unhlm-tb-key-targets-and-commitments>.
50. Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Tüberküloz Dairesi Başkanlığı Ankara, 2022. ISBN: 978-975-590-842-7 Sağlık Bakanlığı Yayın No: 1229

51. Türkiye’de Veremle Mücadelenin Tarihi ve Dünden Bugüne Daire Başkanlığımız. <https://hsgmdstek.saglik.gov.tr/tr/tuberkuloz-baskanligimiz/tarihte.html> (erişim:11.06.2023).
52. Woods GL, Washington JA. Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis: review of microbiologic and clinical aspects. Rev Infect Dis., 1987; 79:275-9
53. <https://lpsn.dsmz.de/genus/mycobacterium> erişim: 05/07/2023
54. Wayne, L. G, Kubica, G. P. (1998). Mycobacteria In: P.H.A.Sneath, (ed), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1435-1457.
55. Forbes, B. A., Hall, G. S., Miller, M. B., Novak, S. M., Rowlinson, M. C., Salfinger, M., Somoskövi, A., Warshauer, D. M., & Wilson, M. L. (2018). Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. Clinical microbiology reviews, 31(2), e00038-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00038-17>
56. Runyon E.H. Mycobacterium intracellulare, relationship of atypical acid fast bacilli to human disease. American Review of Respiratory Disease, 1967; 95:61-86
57. Tortoli E. (2014). Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus Mycobacterium. Clinical microbiology reviews, 27(4), 727–752. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-14>
58. Çavuşoğlu, C. (2010). Mycobacterium tuberculosis genomu ve genetik özellikleri. In: Bilgiç, H., Karadağ, M., Tozkoparan, E., Çoskun, F. Toraks kitapları Tüberküloz. sayı111, İstanbul. Aves yayıncılık. 52-61
59. Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. Res Vet Sci. 2014;97(S):S5-S19. doi:10.1016/j.rvsc.2014.02.009
60. Rojas-Espinosa O, Lovik M. Mycobacterium leprae and Mycobacterium lepraemurium infections in domestic and wild animals. Rev Sci Tech. 2001;20(1):219-51
61. Walsh DS, Portaels F, Meyers WM. Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans infection). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2008;102(10):969-78.

62. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC. 2010 Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 16:1296 –1299. <https://doi.org/10.3201/eid1608.100314>
63. Gupta, R.S., Lo, B., and Son, J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera." *Front. Microbiol.* (2018) 9:67. [Corrigendum: *Front. Microbiol.* (2019) 10:714. (PMID 31024493)]
64. Fedrizzi T., Meehan C. J., Grottola A., Giacobazzi E., Fregni S. G., Tagliazucchi S., et al.. (2017). Genomic characterization of Nontuberculous *Mycobacteria*. *Scientific reports*,7:45258. 10.1038/srep45258
65. Meehan, C. J., Barco, R. A., Loh, Y. E., Cogneau, S., & Rigouts, L. (2021). Reconstituting the genus *Mycobacterium*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 71(9), 004922. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004922>
66. Öngüt G, Gündoğdu N, Özyurt M, Atik TK, Aslan G. Mikobakteriler. İçinde: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Başustaoğlu A, Us AD (Çeviri editörleri). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. 7 baskı, Ankara, Hipokrat Yayınevi, 2017:1219-1260.
67. Daffé, M., & Marrakchi, H. (2019). Unraveling the Structure of the *Mycobacterial* Envelope. *Microbiology spectrum*, 7(4), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018>
68. Alderwick, L. J., Harrison, J., Lloyd, G. S., & Birch, H. L. (2015). The *Mycobacterial* Cell Wall--Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(8), a021113. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021113>
69. Medjahed H, Gaillar, JL, Reytrat J. M. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends in microbiology* 2010, 18(3), 117-123.
70. Köksal, F. ve Yaman, A. 2003. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvar yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun, Sempozyum Kitabı: 34-47.

71. Fleischmann, R. D., Alland, D., et al (2002). Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *Journal of bacteriology*, 184(19), 5479–5490. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5479-5490.2002>
72. Aslan, G., & Yapıcı, G. (2022). Tüberküloz İmmünolojisi; Kadim Hastalığın Ambivalansı Şaşırtmaya Devam Ediyor. *Turkish Journal of Immunology*, 10(3)
73. Rahlwes, K. C., Dias, B. R. S., Campos, P. C., Alvarez-Arguedas, S., & Shiloh, M. U. (2023). Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*, 14(1), 2150449. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150449>
74. Ehrh, S., Schnappinger, D., & Rhee, K. Y. (2018). Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature reviews. Microbiology*, 16(8), 496–507. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0013-4>
75. Oğuz AV. Tüberküloz basilinin bulaş yolları ve konaktaki seyri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran 2003. Samsun. Kongre Kitabı, 48-58
76. Lyon, S. M., & Rossman, M. D. (2017). Pulmonary Tuberculosis. *Microbiology spectrum*, 5(1), 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016.
77. Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, Raviglione M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *N Engl J Med*. 2015;372(22):2127–35.
78. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 1: prevention – tuberculosis preventive treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
79. Öztürk R. Tüberkülozda Doğal Direnç Ve Risk Faktörleri 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun: 58-73
80. Rook, G. A., & Zumla, A. (2001). Advances in the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Current opinion in pulmonary medicine*, 7(3), 116–123. <https://doi.org/10.1097/00063198-200105000-00002>
81. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/tb-research-and-innovation>

82. Branigan D, Pipeline Report 2022 Tuberculosis Diagnostics, Nov2022, treatment action group TAG. <https://www.treatmentactiongroup.org/resources/pipeline-report/2022-pipeline-report/>
83. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 1: prevention - tuberculosis preventive treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
84. Behr MA, Edelstein PH, Ramakrishnan L. Revisiting the timetable of tuberculosis. BMJ. 2018;362:k2738.
85. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 2: screening - systematic screening for tuberculosis disease. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
86. Rapid communication: TB antigen-based skin tests for the diagnosis of TB infection. Geneva: World Health Organization; 2022 (WHO/UCN/TB/2022.1). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
87. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
88. <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021/research-innovation> erişim: 08.08.2023
89. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis. Tests for tuberculosis infection. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
90. Ed: Özçelik U, Kocabaş E, Ersu R, Gürkan F. 2017 Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. TORAKS KİTAPLARI • SAYI 23 • TEMMUZ 2017. ISBN: 978-605-335-324-9. Çocukluk Çağında Tüberküloz Tanı, Tedavi ve Korumada Güncel Yaklaşımlar ve Olgu Örnekleri. Bölüm: Özçelik Ü. Tüberkülin Deri Testi. Sfy: 27-30.
91. Koppaka R, Bock N. How reliable is chest radiography? In ed. T. Frieden. Toman's tuberculosis case detection, treatment, and monitoring : questions and answers.– 2nd ed. P. 51-60. WHO/HTM/TB/2004.334

92. Screening and Triage for TB using Computer-Aided Detection (CAD) Technology and Ultra-portable X-Ray Systems: A Practical Guide: <http://www.stoptb.org/dhthub/practicalguide.asp...https://www.ai4hlth.org/>).
93. <https://who.tuberculosis.recmap.org/recommendation/025b56f9-5040-4014-bb7e-30bfc2ffc6cb>
94. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR) 2014.tb.thsk.gov.tr/UTTR.pdf
95. Brooks G F, Carroll K C, Butel J S, Morse S A. Tıbbi Mikrobiyoloji. Jawetz, Melnick, &Adelberg's Medical Microbiology. Twenty-Fourth Edition, The McGraw-Hill Companies. Çeviri: Yenen O Ş. Kitap:Jawetz, Melnick ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2010:320-332.
96. Acharya B, Acharya A, Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. Molecular Biology Reports (2020) 47:4065–4075 <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05413-7>
97. Erdal G, Sürücüoğlu S, Özkütük N. Tüberküloz tanısında LED floresan mikroskopinin performansının değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 622 – 631
98. World Health Organization. (2011). Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44602>
99. Ákos Somoskövi, Csaba Ködmön, Ákos Lantos, Zoltán Bártfai, Lilla Tamási, Judit Füzy, Pál Magyar et al. Comparison of Recoveries of Mycobacterium tuberculosis Using the Automated BACTEC MGIT 960 System, the BACTEC 460 TB System, and Löwenstein Jensen Medium. Vol. 38, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2000
100. WHO (2007) Use of Liquid TB Culture and Drug Susceptibility Testing in Low and Medium Income Settings. WHO, Geneva
101. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson M-C, Salfinger M, Somoskövi A, Warshauer DM, Wilson ML. 2018. Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: mycobacteria. Clin Microbiol Rev 31:e00038-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00038-17>.

102. Çelik Ü, Kocabaş E Ed: Özçelik U, Kocabaş E, Ersu R, Gürkan F. 2017 Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. Toraks Kitapları • Sayı 23 • Temmuz 2017. Isbn: 978-605-335-324-9. Çelik Ü, Kocabaş E. Çocuk Tüberkülozunda Mikrobiyolojik Tanı. Sfy:31-40
103. BACTEC MGIT 960 System, User's Manuel. Becton Dickinson. Sparks, Maryland, USA 2004
104. Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. Newyork. Second edition. Washington, DC, ASM; 2004
105. Özyurt M. Akciğer ve Akciğer Dışı Tüberküloz Tanısında Moleküler Yöntemlerin Kullanımı. Mikrobiyol Bul 2012; 46(2): 319-331.
106. [https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021/tb-diagnosis - treatment/diagnostic-testing](https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021/tb-diagnosis-treatment/diagnostic-testing)
107. WHO standard: universal access to rapid tuberculosis diagnostics. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
108. Ed: Durmaz R, Eser Ö, Otlı B: Moleküler Mikrobiyoloji Tanı ve Epidemiyoloji içinde: Sürücüoğlu S. Tüberkülozun Tanısı ve Direncin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin kullanımı. Sfy 497-512: 2022 Ankara
109. Practical manual on tuberculosis laboratory strengthening, 2022 update. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
110. <https://www.molecular.abbott/int/en/products/instrumentation/m2000-realtime-system>
111. Jiang, J., Yang, J., Shi, Y., Jin, Y., Tang, S., Zhang, N., Lu, Y., & Sun, G. (2020). Head-to-head comparison of the diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis: a meta-analysis. Infectious diseases (London, England), 52(11), 763–775. <https://doi.org/10.1080/23744235.2020.1788222>
112. Practical manual of processing stool samples for diagnosis of childhood TB. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
113. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis complex: technical guide. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.19). Licence: CC BY-NCSA 3.0 IGO

114. Kambli, P., Ajbani, K., Kazi, M., Sadani, M., Naik, S., Shetty, A., Tornheim, J. A., Singh, H., & Rodrigues, C. (2021). Targeted next generation sequencing directly from sputum for comprehensive genetic information on drug resistant Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland), 127, 102051. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102051>
115. Shah, M., Hanrahan, C., Wang, Z. Y., Dendukuri, N., Lawn, S. D., Denkinger, C. M., & Steingart, K. R. (2016). Lateral flow urine lipoarabinomannan assay for detecting active tuberculosis in HIV-positive adults. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2016(5), CD011420. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011420.pub2>
116. Lobue P, Menzies D. Treatment of latent tuberculosis infection: An update. *Respirology*. 2010;15(4):603–22.
117. Akolo C, Adetifa I, Shepperd S, Volmink J. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV infected persons. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(1) <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD000171.pub3/abstract>, accessed 15 March 2020).
118. Özlü T. Latent Tüberküloz Enfeksiyonu ve Tedavisi. *Akciğer Sağlığı ve Yoğun Bakım Derneği (ASYOD)*. Ağustos 2018
119. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-susceptible tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
120. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
121. McKenna L. Tuberculosis Treatment Pipeline Report 2022. New York: Treatment Action Group; 2022. https://www.treatmentactiongroup.org/wp-content/uploads/2023/01/pipeline_TB_Treatment_2022_final.pdf
122. Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>

123. Özçelik U. Kocabaş E. Ersu R. Gürkan F. Ed. Çocukluk Çağında Tüberküloz. İçinde Çakır E. Karakoç F. Tedavinin Temel İlkeleri, Klinik Sınıflandırma ve Tedavi Rejimleri. Toraks Kitapları. Sayı 23. Temmuz 2017. 61-66
124. American Academy of Pediatrics. Tuberculosis, in summaries of infectious diseases. Red Book: report of the committee on infectious diseases 2015: 805-31.
125. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: Treatment of tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167: 603- 62.
126. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 5: management of tuberculosis in children and adolescents. Geneva: World Health Organization; 2022 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/352522>)
127. Use of bedaquiline in children and adolescents with multidrug- and rifampicin-resistant tuberculosis: information note. Global Tuberculosis Programme. ISBN: 9789240074286. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240074286>
128. Use of delamanid in children and adolescents with multidrug- and rifampicin-resistant tuberculosis: information note. Global Tuberculosis Programme. ISBN: 9789240074309. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240074309>
129. <https://tbksp.org/en/node/575> erişim 15.08.2023
130. Otlı B, Yakupoğulları Y., (2019). Tüberküloz immünopatogenezi: doğal bağışık yanıt ve tedavi hedefleri için köşe taşları. Her Yönüyle Tüberküloz (pp.16-27), Ankara: Hipokrat Yayıncılık.
131. Furin, J., Cox, H., & Pai, M. (2019). Tuberculosis. Lancet (London, England), 393(10181), 1642–1656. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30308-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3)
132. <https://www.who.int/news-room/events/detail/2014/03/24/default-calendar/world-tuberculosis-day-2014>
133. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı, “Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi”: sfy3/22: Yayın No: 935 Ankara: 2014: ISBN: 978-975-590-486-3

134. De Magalhães, V. D., de Melo Azevedo, F.daP., Pasternak, J., & Valle Martino, M. D. (2002). Reliability of hsp65-RFLP analysis for identification of Mycobacterium species in cultured strains and clinical specimens. *Journal of microbiological methods*, 49(3), 295–300. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00386-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00386-4)
135. Varma-Basil, M., Pathak, R., Singh, K., Dwivedi, S. K. D., Garima, K., Kumar, S., ... & Bose, M. (2010). Direct early identification of Mycobacterium tuberculosis by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis from clinical samples. *Japanese journal of infectious diseases*, 63(1), 55-57).
136. López, A., Acosta, F., Sambrano, D., Tarajia, M., Navajas, S., Arias, F., Escobar, B., Ortis, P., Adames, F., & Goodridge, A. (2021). Direct Molecular Characterization of Acid-Fast Bacilli Smear of Nontuberculosis Mycobacterium Species Causing Pulmonary Tuberculosis in Guna Yala Region, Panama. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 105(3), 633–637. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0096>
137. TARHAN, G., ŞİMŞEK, H., Tursunoğlu, F., Tombak, A., Coşkun, E., Güner, U., CEYHAN, İ.(2011). Akciğer Kaynaklı ve Akciğer Dışı Klinik Örneklerde Mycobacterium tuberculosis’in Hızlı Tanısı İçin Artus® M. tuberculosis Rotor Gene (RG) Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Sisteminin Retrospektif Değerlendirmesi. *Türk Klinik Laboratuvar Dergisi* , vol.2, no.3, 94-100.
138. ABDULMAJED, O., KOÇ, A. N., GÜLTEKİN, A., & ATALAY, M. A. (2013). Klinik Örneklerde Mycobacterium tuberculosis Saptanmasında İki Gerçek Zamanlı PCR Sisteminin Tanısal Performansının Karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 43(4), 130-137
139. Timur D., Parkan Ö., Kılıç H. , Atalay A. , Tekinşen F. F. , Koç A. N. Mycobacterium tuberculosis Tanısında İki Farklı Gerçek Zamanlı PCR Yönteminin Değerlendirilmesi. *Medical Research Reports*. 2023; 6(1): 12-18
140. DURMAZ R. Tüberkülozda Hızlı Moleküler Tanı Testleri, *ANKEM Derg* 2012;26(Ek 2):72-81
141. Molecular assays intended as initial tests for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB and rifampicin resistance in adults and children: rapid communication. Policy update. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

EKLER

EK.1. Etik Kurul Kararı

