

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**KLİNİK ÖRNEKLERDE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***  
**TANISINDA HIZLI BİR *REAL TIME-PCR (MTB/RIF)* TESTİNİN**  
**KONVANSİYONEL YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Onur ÇAĞLAYAN**

Tez Danışmanı

**Prof. Dr. Mehmet ÜNLÜ**

**BALIKESİR - 2014**

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***  
**TANISINDA HIZLI BİR *REAL TIME-PCR (MT/RIF)* TESTİNİN**  
**KONVANSİYONEL YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Onur ÇAĞLAYAN**

Tez Danışmanı

**Prof. Dr. Mehmet ÜNLÜ**

Bu araştırma; Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2012-80 nolu proje ile desteklenmiştir.

**BALIKESİR - 2014**



T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan

**“Klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* tanısında hızlı bir Real Time-PCR  
(MT/RIF) testinin konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılması”**

başlıklı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Onur ÇAĞLAYAN**

Tez Savunma Tarihi: 27 /06 / 2014

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Mehmet ÜNLÜ  
Balıkesir Üniversitesi  
Başkan

Prof. Dr. Gülhan VARDAR-ÜNLÜ  
Balıkesir Üniversitesi  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Dr. Serpil PAKSOY  
Balıkesir Üniversitesi  
Üye

Yukarıdaki Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun 16.07.2014 tarih ve 2014/15 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özlem YAVUZ  
Enstitü Müdürü

Yrd. Doç. Dr. Zahver Ege HİŞMİOĞULLARI  
Enstitü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim. 10/06/2014



**Onur ÇAĞLAYAN**

## TEŐEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bilgisi ve deneyimlerinden faydalanmış olduğum, öğrenimime büyük katkıda bulunan, danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mehmet ÜNLÜ'ye, Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. öğretim üyeleri Prof. Dr. Gülhan VARDAR-ÜNLÜ'ye, Prof. Dr. M.Tevfik YAVUZ'a, Balıkesir Göğüs Hastalıkları Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı sorumlusu Uzman Dr. Nermin ÖZEN'e tez çalışmalarımnda bana destek veren, her an yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen Biyolog Aslı Beril KARAKAŐ'a, aynı ortamı paylaşmaktan ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere en büyük emeğre sahip olan, maddi ve manevi her türlü desteklerini esirgememiş olan annem Hülya ÇAĞLAYAN'a ve babam Mehmet ÇAĞLAYAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	x
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	2
2.1. Tüberkülozun Tarihçesi .....	2
2.1.1. Dünya'da Tüberkülozun Tariçesi .....	2
2.1.2. Ülkemizde Tüberkülozun Tarihçesi .....	3
2.2. Günümüzde Tüberküloz.....	4
2.2.1. Dünya'da Tüberküloz .....	4
2.2.2. Ülkemizde Tüberküloz.....	7
2.3 Mikobakteriler.....	8
2.3.1. Mikobakterilerin Karakteristik Özellikleri.....	9
2.3.2. İnsan Patojeni <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex Üyeleri.....	14
2.4. Tüberkülozun Bulaşması ve Patogenezi .....	17
2.4.1. Bulaşma.....	17
2.4.2. Patogenez .....	18
2.5. Tedavi ve Direnç .....	21
2.6. Klinik Materyallerin Uygun Şekilde Alınması ve Laboratuvara Ulaştırılması .....	22
2.6.1. Akciğer Tüberküloz Örnekleri .....	24
2.6.2. Akciğer Dışı Tüberküloz Örnekleri .....	25
2.7. Tüberküloz Tanı Yöntemleri.....	26
2.7.1. Klasik Yöntemler .....	26
2.7.2.Kültür Yöntemleri.....	29
2.7.3. Moleküler Yöntemler.....	34
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	40
3.1. Gereç .....	40
3.2. Yöntem.....	40

3.2.1. Dekontaminasyon ve Homojenizasyon.....	40
3.2.2. Ehrlich Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi .....	41
3.2.3. Kültür .....	42
3.2.4. MTB Tiplendirme .....	43
3.2.5. Moleküler Yöntem .....	44
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	45
<b>4.BULGULAR</b> .....	<b>46</b>
4.1. ARB Boyama ve Kültür Verilerinin Kıyaslanması.....	47
4.1.1. ARB (+) Hasta Sonuçları .....	47
4.1.2. ARB (-) Hasta Sonuçları .....	48
<b>5.TARTIŞMA</b> .....	<b>51</b>
<b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>55</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>57</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>69</b>

## ÖZET

### **Klinik Örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* Tanısında Hızlı Bir *Real Time-PCR (MTB/RIF)* Testinin Konvansiyonel Yöntemlerle Karşılaştırılması**

Bu çalışmanın amacı, *M. tuberculosis* tanısında, GeneXpert®MTB/RIF (Sunnyvale, USA) moleküler yönteminin konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırılmasıdır.

Bu çalışmada, Balıkesir Üniversitesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Balıkesir-Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, Eylül 2012 ile Mayıs 2014 tarihleri arasında, primer tüberküloz (TB)'lu hastalardan alınan 96 klinik örnek kullanılmıştır.

Klinik örneklerin Erlich-Ziehl Neelsen (EZN) boyama ile mikroskopik incelemesi, L-J ve VersaTrek yöntemleri ile kültürleri ve antimikobakteriyel duyarlılık testleri yapıldı. VersaTrek sıvı kültür yöntemi ile üretilen bakteriler, tekrar mikroskopi ile incelendi ve tip tayini yapılarak *M. tuberculosis* kompleks olduğu doğrulandı. ARB (+) olan 89 örnek ve ARB (-) olup VersaTrek kültür incelemesi pozitif olan 7 örnek olmak üzere, primer TB'lu hastadan alınan toplam 96 örnek, konvansiyonel yöntemlere ek olarak, moleküler tanı amacıyla MTB/RIF yöntemi ile *M. tuberculosis* kompleks ve RIF direnci yönünden incelemeye alındı. Kültür yöntemiyle antimikrobiyal duyarlılık testi uygulanan hasta örneklerinin 1'inde RIF direnci saptanırken, MTB/RIF yöntemiyle bu örnekte RIF direnci saptanmadı. İncelemeye alınan 96 örnekte, kültür yöntemleri kullanarak, L-J ve VersaTrek ile sırasıyla %62.5 (60) ve %81.3 (78) oranında pozitiflik saptandı. MTB/RIF yöntemi ile incelenen 96 örneğin %93.8'i (90) pozitif olarak bulundu. ARB (+) 89 örneğin %97.8'i (87) ve ARB (-) 7 örneğin ise %42.9'u (3) pozitif olarak bulundu.

Sonuç olarak; GeneXpert®MTB/RIF yönteminin, kolay uygulanması, kısa sürede sonuç vermesi, duyarlılığının yüksek düzeyde olması ve konvansiyonel yöntemlerle kıyaslanabilir veya daha iyi sonuçlar vermesi nedeniyle primer TB vakalarının tanı süresini kısaltmada önemli rol oynayabileceği değerlendirilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, Erlich-Ziehl Neelsen, GeneXpert®MTB/RIF, VersaTREK, rifampisin.



## ABSTRACT

### Comparison of A Real Time PCR (MTB / RIF) Test with Conventional Methods in the Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens

The purpose of the current study to compare GeneXpert<sup>®</sup>MTB/RIF (Sunnyvale, USA) molecular method with conventional methods in the diagnosis of *M. tuberculosis* in 96 clinical specimens that were taken from patients with primary tuberculosis (TB) who were admitted to Balıkesir University Hospital and Balıkesir Thoracic Diseases Hospital between September 2012 to May 2014.

Microscopic examination by Erlich-Ziehl Neelsen (EZN) staining, L-J and VersaTrek culture and antimycobacterial susceptibility testing of specimens were performed. The bacteria grown by VersaTrek liquid culture were examined by microscopy and confirmed by typing to be *M. tuberculosis* complex. 89 ARB (+) specimens and 7 ARB (-), VersaTrek culture positive specimens, a total of 96 specimens taken from the patients with primary tuberculosis, were examined by GeneXpert<sup>®</sup>MTB/RIF in molecular diagnosis of *M. tuberculosis* complex and RIF resistance in addition to conventional methods. RIF resistance has not been detected by MTB/RIF method in the specimens but one of them detected by antimicrobial susceptibility testing by culture method. In 96 specimens examined by using culture methods, L-J and Versatrek were found to be positive as 62.5% (60) and 81.3% (78), respectively. Of the 96 specimens examined by MTB/RIF method, 93.8% (90) were found to be positive. Of the 90 positive specimens, 45.6% (41) were medium-level, 27.8% (25) low-level, 24.4% (22) high-level and 2.2% (2) very low-level positive. 97.8% (87) of the ARB (+) 89 specimens, 42.9% (3) of the ARB (-) 7 specimens were found to be positive.

In conclusion, GeneXpert<sup>®</sup>MTB/RIF method was considered to play an important role in early diagnosis of primary TB cases due to being easy to use, performed in a short time, having high sensitivity and comparable or better results than conventional methods.

**Anahtar Kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, Erlich-Ziehl Neelsen, GeneXpert<sup>®</sup>MTB/RIF, VersaTREK, rifampisin.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AİDT	: Antimikobakteriyel İlaç Duyarlılık Testleri
AMS	: Açlık Mide Suyu
AR	: Auramin-Rhodamin
ARB	: Aside Dirençli Bakteri
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
BCG	: Bacille Calmette-Guerin
CD4 <sup>+</sup> T <sub>H</sub>	: Yardımcı T Lenfosit
CD8 <sup>+</sup> T <sub>C</sub>	: Sitotoksik T Lenfosit
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CPC	: Setilpiridinyum Klorür
ÇİD-TB	: Çoklu İlaç Dirençli Tüberküloz
DGTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EMB	: Etambutol
EZN	: Ehrlich Ziehl-Neelsen
HSP	: Heat Shock Protein (Isı Şok Proteini)
IFN- $\gamma$	: İnterferon-gamma
IL-1 $\beta$	: İnterlökin-1beta
IL-2	: İnterlökin-2
IL-6	: İnterlökin-6
IL-12	: İnterlökin-12
INH	: İzoniyazid
LAM	: Lipo Arabinomannan

LAMP	: Loop Mediated Amplification (İlmik Aracılı ođaltma)
LCR	: Ligase Chain Reaction (Ligaz Zincir Tepkimesi)
L-J	: Löwenstein Jensen
ManLAM	: Mannosylated Lipoarabinoannan
MIP-2	: Makrofaj İnflammatuvar Proteini-2
MTB	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
NALC-NaOH	: N-Asetil-L-Sistein-Sodyum hidroksit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NK	: Doğal Öldürücü Hücre
PAS	: Para Amino Salisilik asit
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Tepkimesi)
PZA	: Pirazinamid
RIF	: Rifampin
rRNA	: Ribozomal RNA
RT-PCR	: Real Time-PCR (İzlenebilir-PCR)
SDA	: Strand Displacement Amplification (İplikçik Ayırma oğaltması)
SM	: Streptomisin
SPS	: Sodyum Poliyanetol Sülfonat
TB	: Tüberküloz
T <sub>H</sub> 1	: T Helper-1
TMA	: Transcription Mediated Amplification (Transkripsiyon Aracılı ođaltma)
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$
UV	: Ultraviyole
VT	: VersaTREK
Wax D	: Balmumu

YİD-TB : Yaygın İlacı Dirençli Tüberküloz

Z-TSP : Zefiran-Trisodyum Fosfat

# ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

---

Şekil 1. Tüm Formlardaki Tahmini Yeni Tüberküloz Vakaları (Yıllık 100.000:1) (WHO, 3 Mart 2013). .....	6
Şekil 2. MDR-TB Vakaları (WHO, 3 Mart 2013). .....	6
Şekil 3. Mikobakteriyel Hücre Duvar Yapısı (Alp; 2010). .....	10
Şekil 4. Kord Faktör (Engelkirk ve Duben-Engelkirk, 2008) .....	12
Şekil 5. Tüberküloz hastalığının oluşum evreleri (Braun ve Anderson, 2007). .....	19
Şekil 6. Karbol Fuksin Yöntemi ile Boyanan TB Basilleri (Ajobiewe ve Tiri, 2013). .....	27
Şekil 7. Florokrom boyama yöntemiyle boyanmış TB basilleri (Zhang ve ark., 1998). .....	29
Şekil 8. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR) aşamaları (Kalof ve ark, 2010). .....	36
Şekil 9. Real Time PCR'da Kullanılan 1. Taqman 2. FRET ve 3. Molecular Beacon Prob Sistemleri (Çavuşoğlu, 2003). .....	39

## TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

<b>Tablo 1.</b> Tüberküloz Vakaları ve Tüberküloza Bağlı Ölümlerdeki Tahmini Veriler, 1990-2012 (1:1.000.000) (WHO, 10 Aralık 2013).....	5
<b>Tablo 2.</b> Ülkemizde 2005-2012 Yılları Arası TB Hasta Oranları ve Yüzdeleri (WHO, 3 Mart 2013)..	7
<b>Tablo 3.</b> Ülkemizde Yaşlara ve Cinsiyete Göre TB Olgu Oranları (WHO, 3 Mart 2013). ....	8
<b>Tablo 4.</b> Ülkemizde 1990 ile 2012 Yılları Arasında Yeni ve Nüks Eden TB Olgu Oranları (WHO, 10 Aralık 2013). ....	21
<b>Tablo 5.</b> Mikobakteri Kültüründe Kullanılan Seçici Olmayan Katı Besiyerleri ve İçerikleri (Della-Lata, 2007). ....	31
<b>Tablo 6.</b> Mikobakteri Kültüründe Kullanılan Seçici Katı Besiyerleri ve İçerikleri (Della-Lata, 2007). ....	32
<b>Tablo 7.</b> Çalışmaya Katılan Hastaların Cinsiyetlerine ve Yaş Durumlarına Göre Dağılımları. ....	46
<b>Tablo 8.</b> Çalışmada Kullanılan Örnek Çeşitlerinin Sayı ve Yüzde Dağılımları. ....	46
<b>Tablo 9.</b> ARB (+) Hastaların VersaTREK ve Cepheid RT-PCR Verileri. ....	47
<b>Tablo 10.</b> ARB (+) Hastaların L-J ve Cepheid RT-PCR Verileri.....	48
<b>Tablo 11.</b> ARB (-) Hastaların VersaTREK ve Cepheid RT-PCR Verileri. ....	48
<b>Tablo 12.</b> ARB (-) Hastaların L-J ve Cepheid RT-PCR Verileri.....	49
<b>Tablo 13.</b> Çalışılan 96 Örnekte Kültür ve Moleküler Yöntem Verileri ile ARB Verilerinin Karşılaştırılması.....	49

# 1.GİRİŞ

Tüberküloz (TB), Koch basili ya da *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) adı ile bilinen bakterinin neden olduğu ve yıllar içerisinde artış ve azalmalar göstererek tüm Dünyada hala önemini koruyan, çoğunlukla akciğerlerde ortaya çıkan bulaşıcı, granülamatöz bir hastalıktır. Genellikle solunum yoluyla vücuda girer ve vücut içerisine alındıktan sonra diğer organlara da yayılarak hastalık oluşturabilir. Tüberküloz tedavi edilmez, düzenli olarak tedaviye devam edilmez ya da tedavi yarım bırakılırsa, dirençli suşlar ortaya çıkabileceği gibi öldürücü de olabilir.

Bulaşıcı bir hastalık olan TB'un tedavisinde, tanının kısa süre içerisinde konulmasıyla, hem hastalığın çevreye daha fazla yayılması önlenmiş olur; hem de tedaviye daha erken başlanılarak hastalığın daha fazla ilerlemesi engellenmiş olunur. Kesin tanının konulabilmesi için mikrobiyolojik incelemelerin yapılması gereklidir.

Çalışmamızda; Balıkesir Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nden alınan klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* tanısında GeneXpert® MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA) yöntemi ile konvansiyonel yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tüberkülozun Tarihçesi

#### 2.1.1. Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi

Halk dilinde tüketim hastalığı, beyaz ölüm, beyaz veba, ölümün kaptanı, kral hastalığı ve daha birçok farklı isimlerle anılan tüberküloz hastalığının etkeni olan bakteri, 300 milyon yıldan bu yana, doğanın her yerinde bulunmaktadır (Barış, 2010; Daniel 2006; Dormandy, 1999). İnsanların sert ve soğuk iklim şartlarından daha iyi korunabilmek amacıyla evcilleştirdikleri sığırlarla aynı ortamı paylaşmaları sonucu, sığırlardaki *Mycobacterium bovis*'in mutasyonla *Mycobacterium tuberculosis*'e dönüşerek insanlara geçebildiği düşünülmekteydi. Genetik çalışmalar başladıktan sonra insanlarda patojen olan basilin, sığırlarda bulunan basilin mutasyonu sonucu oluşmadığı, ancak her ikisinin de ortak bir atadan geldikleri ortaya çıkmıştır. İlk olarak İsa'nın doğumundan yaklaşık olarak 3.000 yıl kadar önce Nil nehri yakınlarında bulunan, günümüzdeki adıyla Dra Abu-el-Naga kasabasında kanlı balgam çıkararak ölen bir kızda ortaya çıktığı düşünülür (Barış, 2010; Brosch ve ark., 2002). 2.500 yıl kadar önce ise Kos adasında Hipokrat'ın kitaplarında bahsedilmiştir (Wouk, 2010). Ayrıca eski Romalı ünlü bir hekim olan Kapadokyalı Areteus, veremin en belirgin özelliklerini şu şekilde sıralamıştır:

1. Kanlı balgam ve kronik öksürük ile birlikte, sesleri kısıktır.
2. Boyunları hafif bükük ve sert, parmakları silindirik ve eklemleri şiş, vücutları iyice zayıfladığı için kemikleri belirgindir.
3. Tırnakları eğri, yassı ve kırılğan yapıdadır. Burun, keskin ve silindirik olup yanakları, gözle görülür bir şekilde pembeleşmiştir.
4. Gözler, iyice çukura çekilmiştir.
5. Yüzleri, kadavra gülüşü durumundadır.
6. Kol ve bacak kasları erimiştir.



7. Kadınların sadece meme başları kalmıştır ve kaburgaların başladığı-sonlandığı yerler ve eklemler, net bir şekilde seçilebilmektedir.
8. Skapulalar, kuş kanadı halini almıştır (Adams, 5 Şubat 2013).

Berlin Fizyoloji Topluluğu'nun 1882 yılı Mart ayındaki toplantısında, bakteriyolojinin kurucularından birisi olan Robert Koch, verem hastalığı etkeni olarak tüberküloz basilini keşfettiğini açıklamıştır (Sakula, 1982). TB, yoksul kesimlerde çok daha yaygın olsa da toplumun en üst seviyesinde bulunan kişilerde bile kendisini gösterebilmektedir (Çalışır, 5 Şubat 2013). Yakın geçmişte, antibiyotiklerin keşfi ile etkinliğini kaybeden TB basilinin, antibiyotiklere dirençli ve hatta neredeyse tüm bilinen antibiyotiklere dirençli olan süper dirençli genetik yapıya sahip yeni suşlarının ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu yüzden TB hastalığının erken tanısı ve tam tedavisinin yapılabilmesi, tekrar önem kazanmıştır (Baylan, 2012).

### **2.1.2. Ülkemizde Tüberkülozun Tarihçesi**

Bütün Dünya'da olduğu gibi, birçok farklı milletin bir arada bulunduğu Osmanlı İmparatorluğu'nda da hastalık, oldukça sık görülmekteydi. Halk sağlığına önem veren II. Abdülhamit döneminde, Robert Koch'un TB basilini keşfinden kısa bir süre sonra İstanbul'da da balgam boyaması ve basilin gösterilmesi çalışmaları yapılmıştır. Koch'un 1890 yılında, tüberkülinin aşı veya ilaç olarak kullanılabileceğini söylemesi üzerine II. Abdülhamid, bir grup doktoru Berlin'e göndererek tüberkülin yapımı ve uygulamasını öğrenmelerini sağlamıştır. Ancak araştırmacılar 'Gazette Medicale D'Orient' dergisinde, tedavide tüberkülinin işe yaramadığını yayımlamışlardır. Ayrıca akciğerlerin radyolojik olarak incelenmesi için 1897 sonrası Yıldız, Hamidiye Etfal ve Gülhane Hastanelerinde röntgen laboratuvarları kurulmuştur. Halk dilinde "ince hastalık" adıyla bilinen TB, II. Abdülhamit'in babası Sultan Abdülmecit ile dedesi II. Mahmut'un ölümlerine de sebep olmuştur. İmparatorluk içerisinde TB hastalığının ortaya çıkmasındaki en büyük etkenin, Rusların Kafkasya'ya girişi ve sonrasında başlayan göçler olduğu düşünülmektedir (Barış, 2002). Besim Ömer Paşa'nın başında bulunduğu ilk veremle savaş derneği olan "Osmanlı Veremle Savaş Cemiyeti" 1918 yılında kurulmuş; ancak 1920 yılında kapanmıştır (Aksu ve Toprak, 2012). 1923 yılında, Büyük Millet Meclisi açılış konuşmasında Atatürk: 'Tahripkâr emrazı-ı belediyemizden şüphesiz

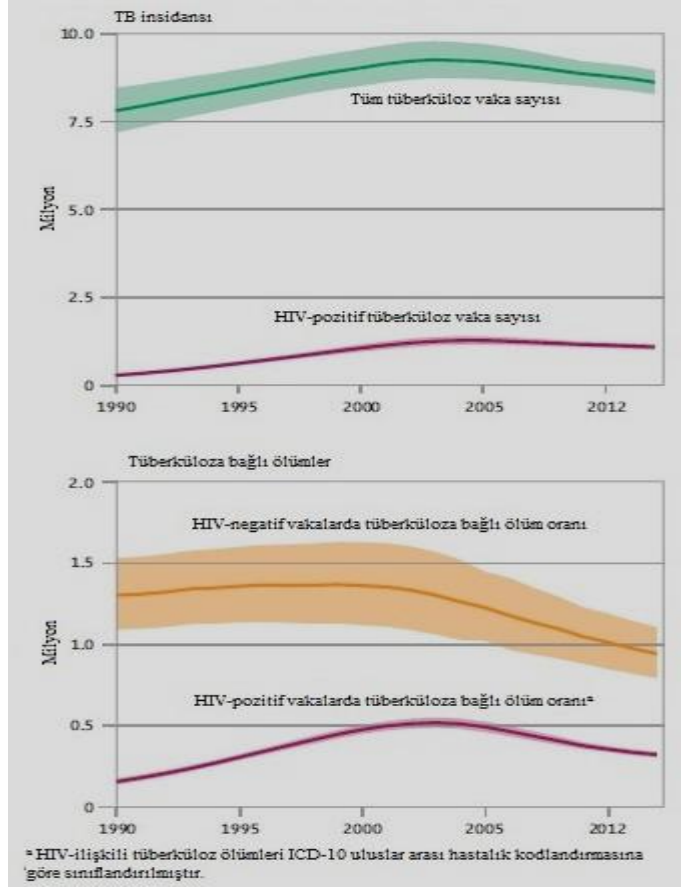
başlıcası olan verem hastalığına karşı, şimdiye kadar ahval ve şeraitin maatteessüf tatbikatına müsaade ve imkân bahşetmediği tedabire başlangıç olmak üzere İstanbul'da 'Veremliler Tedavihanesi' açmak ve bu suretle yeni ve pek lüzumlu bir mücadelenin ilk temel taşı koymak mutasavverdir.' diyerek o yıllarda, ilaçla tedavisi olmayan ve oldukça yaygın olan veremin önemine değinerek verem hastanesi açılmasını istemiştir. Bunun üzerine, aynı yıl içerisinde 'Eyüp Veremle Mücadele Cemiyeti' kurulmuş ve dispanser açılmıştır. Aynı yıl İzmir ve Balıkesir'de 'İzmir Veremle Mücadele Cemiyeti' ve 'Balıkesir Veremle Mücadele Cemiyeti' kurulmuştur (Pekşen, 2010). Daha sonra dönemin Sağlık Bakanı Dr. Refik Saydam tarafından TB ile savaşta önemli bir adım atılarak Prof. Dr. Server Kamil Bey idaresinde olan 16 yataklı 'Heybeliada Sanatoryumu' kurulmuştur (Toraks Bülteni, 10 Nisan 2013). 1930 yılında, Pasteur Enstitüsü'nden getirilen Bacille-Calmette-Guerin (BCG) aşısı, Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü'nde üretilmiş ve uygulanmaya başlanmıştır (Demirhan Erdemir ve Öncel, 2006; Vidinel, 2010). Ancak 1998 yılında, ekonomik sebeplerden dolayı, ülkemizde BCG aşısı üretimi durdurulmuş ve aşı konusunda dışa bağımlı hale gelinmiştir (Buzgan, 2012).

## **2.2. Günümüzde Tüberküloz**

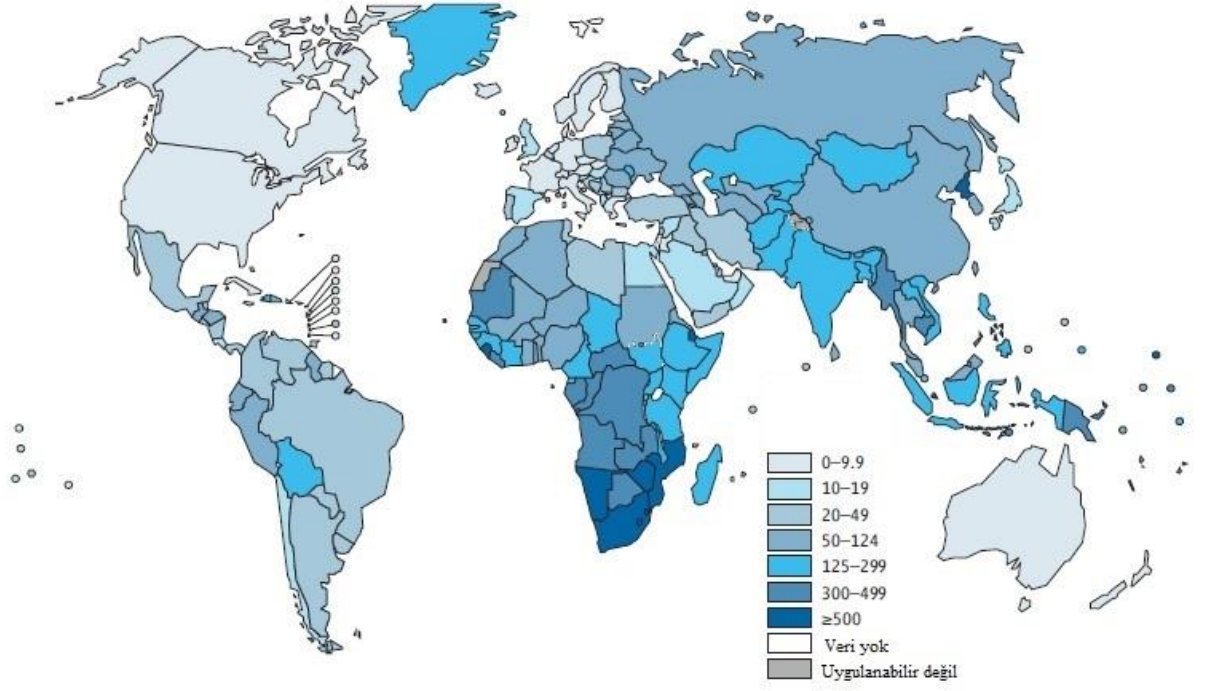
### **2.2.1. Dünyada Tüberküloz**

TB basili, HIV'den sonra tüm Dünyada enfeksiyöz hastalıklarından ölüm sebebi olarak 2. sırada yer almaktadır (Frieden ve ark., 2003). 2012 yılı içerisinde, Tablo 1'de de görüldüğü gibi tüm Dünyada 8.6 milyon yeni olgu bildirilmiş ve bunların da 1.3 milyonu ölümle sonuçlanmıştır. Ölümle sonuçlanan 1.3 milyon olgunun 1 milyonu, HIV-negatif hastalardan, kalan 300.000'i ise HIV-pozitif hastalardan oluşmakta olup hastalık ve ölümler, daha çok erkeklerde görülmektedir.

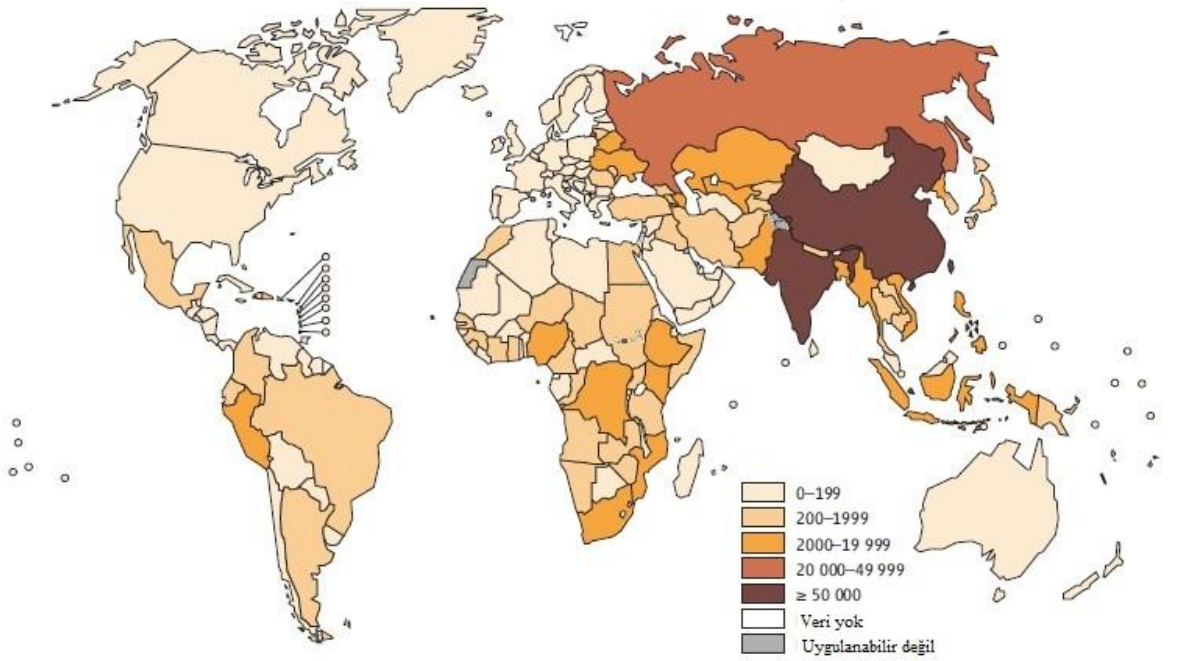
**Tablo 1.** Tüberküloz Vakaları ve Tüberküloza Bağlı Ölümlerdeki Tahmini Veriler, 1990-2012 (1:1.000.000) (WHO, 10 Aralık 2013).



Tahmini olarak 2012 yılı içerisinde, 450.000 kişi çoklu ilaca dirençli tüberküloza (ÇİD-TB) yakalanmış ve bunların da 170.000 kadarı hayatını kaybetmiştir. Dünyadaki TB olgularının oranı, Şekil 1'de görüldüğü gibi Güneydoğu Asya ile Pasifiklerin batı kesimlerinde %58 iken, Afrika bölgesindeki olgular, Dünyadaki tüm olguların yaklaşık olarak %25'ini oluşturmaktadır. Doğu Avrupa ve Orta Asya'nın bazı bölgelerinde ortaya çıkan yaklaşık %20 oranındaki yeni TB olgusunun %50'sinden daha fazlasını ise Şekil 2' de görüldüğü gibi ÇİD-TB oluşturmaktadır. Her ne kadar küresel olarak TB kaynaklı mortalite oranı 1990 yılından günümüze kadar %45 oranında (yılda 100.000 nüfusta 1) azalmış olsa da 2011-2012 yılları arasında; Güney Afrika, Hindistan ve Ukrayna'da, ÇİD-TB olgularında %42 oranında yükselme gözlenmiştir. 2012 yılı sonlarında, 92 ülkede, en az bir yaygın ilaca dirençli tüberküloz (YİD-TB) olgusu bildirilmiş olması oldukça endişe vericidir.



**Şekil 1.** Tüm Formlardaki Tahmini Yeni Tüberküloz Vakaları (Yıllık 100.000:1) (WHO, 3 Mart 2013).



**Şekil 2.** MDR-TB Vakaları (WHO, 3 Mart 2013).

2014-2015 yılları içerisinde, TB hastalığının tanısı, ÇİD-TB olup olmadığının tespiti, antibiyotik duyarlılık testleri, tedavi uygulanması, hızlı tanı testleri yapılabilmesi, ortak HIV-TB aktivitesinin tedavisi ve ilgili laboratuvarın daha güçlendirilebilmesi için düşük ve orta gelirli ülkelerde, yıllık olarak ortalama 7-8 trilyon Amerikan doları gibi oldukça astronomik rakamlar gerekmektedir (WHO, Global Tuberculosis Report, 10 Aralık 2013).

### 2.2.2. Ülkemizde Tüberküloz

TB, Dünyada ve ülkemizde hala en yaygın ve önemli bulaşıcı hastalık olarak toplum sağlığını tehdit etmektedir (Tahaoğlu ve ark., 2012; Kara ve ark., 2012). 1895'ten itibaren 70'li yıllara kadar, oldukça sıkı mücadelenin sonucunda, hastalık ciddi derecede azalmıştır. Daha sonra ÇİD-TB suşlarının ortaya çıkışı ve hastalıkla mücadelede ilgisiz kalınması sonucu artmaya başlamış; ancak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından, 1993 yılında "Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (DGTS) nin TB ile en etkili mücadele yöntemi olduğunun kabul edilip önerilmesi ve 2006 yılından itibaren, ülkemizin her yerinde uygulanmaya başlanmasıyla da TB hastalığına yakalanan kişi sayısı, her yıl %6 oranında yeniden azalmaya başlamıştır. 2005-2006 yılları arasında, yaklaşık 21.000 civarında olan TB hasta sayısı Tablo 2'de de görüldüğü gibi 2012 yılında 14.691'e kadar gerilemiştir (Seber, 2010; T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (1), 2013).

**Tablo 2.** Ülkemizde 2005-2012 Yılları Arası TB Hasta Oranları ve Yüzdeleri (WHO, 3 Mart 2013).

Yıl	HIV durumu bilinen TB'lu Hasta %'si	HIV durumu bilinen TB'lu Hasta sayısı	Bildirilen Hastalar (Tekrarlayan ve yeni)	HIV pozitif TB'lu Hasta Sayısı	Test Edilen HIV pozitif TB'lu Hasta Sayısı
2005	0	0	21.303	0	-
2010	3,5	581	16.551	14	2,4
2011	46	7.241	15.679	29	0,4
2012	59	8.646	14.691	45	0,52

Dünya genelinde olduğu gibi, Türkiye'de de TB hastalık oranına bakıldığında; erkeklerde hastalığa yakalanma oranı (%59), Tablo 3'te de gördüğümüz gibi

kadınlara göre (%41) daha fazladır. Olguların %64'ü akciğer tüberkülozu, %36'sı ise akciğer dışı organ tüberkülozuna yakalanmıştır. Ayrıca, 2012 yılında tedavinin yarıda kesilmesi ve/veya düzensiz ilaç kullanımı sonucu vakaların %2'sinde ÇİD-TB tespit edilmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (2), 2013).

**Tablo 3.** Ülkemizde Yaşlara ve Cinsiyete Göre TB Olgu Oranları (WHO, 3 Mart 2013).

YIL	ERKEK								KADIN								KADIN-ERKEK Oranı	
	0-14	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	65+	Bilinmeyen	0-14	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	65+	Bilinmeyen		
1995	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005	33	1148	1295	1028	963	534	429	0	50	699	474	243	175	166	213	0	2,7	
2010	23	631	779	703	778	514	407	0	33	485	384	193	141	101	203	0	2,5	
2011	22	550	693	608	696	482	412	0	25	409	385	195	117	121	212	0	2,4	
2012	20	507	655	575	650	476	398	0	30	369	308	168	97	105	227	0	2,5	

### 2.3 Mikobakteriler

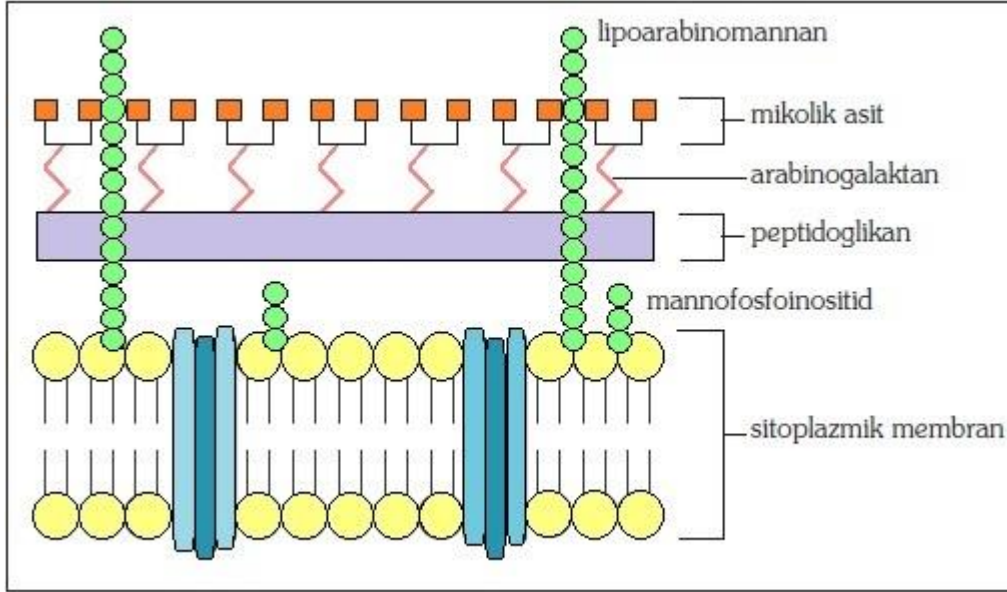
Mikobakteriler, *Mycobacteriaceae* familyası içerisindeki *Mycobacterium* cinsinin üyesidir (Rastogi ve ark., 2001). İsimleri, Yunancadaki 'fungus' anlamına gelen 'myco' ön eki ve sıvı besiyerinde kültüre alındığında oluşturduğu küf benzeri kolonilerden almıştır (Kerr ve Barrett, 1994).

### 2.3.1. Mikobakterilerin Karakteristik Özellikleri

Mikobakteriler, *Mycobacterium marinum* hariç; hareketsiz, aerobik, kapsülsüz ve yine *Mycobacterium marinum* ve *Mycobacterium bovis* hariç, sporsuz bakterilerdir (Ryan ve Ray, 2004; Ghosh ve ark., 2009). Bütün *Mycobacterium* türleri mumlu, mikolik asit ve mikolatça zengin, hidrofobik ve diğer bakterilere göre daha kalın hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarları, mikobakterileri çevresel koşullardan koruduğu gibi, hücreyi bir arada tutar ve normal boyalarla boyanmalarını engeller (Khare ve ark., 2013). Başka bir ayırıcı özelliği ise Ziehl-Neelsen ya da Kinyoun boyama yöntemleri ile boyanarak asit-alkol ile dekolorizasyon işlemine karşı direnç göstermesidir (ASM MicrobeLibrary, 25 Şubat 2013).

#### 2.3.1.1. Mikobakterilerin Hücre Duvar Yapısı

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı, sitoplazma ile sitoplazmik zarı çevreler. Diğer bakteri hücre duvarlarından daha kalın olan yapısı ve hücre duvar yapısındaki peptidoglikanın farklı yapısı, onu diğer bakterilerden ayıran en önemli özelliklerinden birisidir (Gülay, 2003; Khare ve ark., 2013). Basilin hücre duvar yapısı, diğer prokaryotik bakterilere göre daha kalın ve oldukça yüksek oranda da lipid (%60) içermektedir (Özşahin, 1994). Şekil 3'te görüldüğü gibi hücre duvarının en dış kısmında, 60-90 karbonlu mikolik asitler ve uzun-dallı yağ asitleri bulunur (Kocagöz ve Kocagöz, 1997). Bu mikolik asitler, bir polisakarit olan ve hücre duvarının %35'ini oluşturan arabinogalaktanlar aracılığıyla peptidoglikan tabakasına bağlanır (Brennan, 2003). Peptidoglikan tabakası, 'mürein' olarak da bilinen ve mikobakterilerin hücre duvarının en iç kısmı olmasının yanı sıra, hücreye dayanıklılığını ve şeklini veren yapıdır. Peptidoglikan tabaka, N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitlerin, birbirlerine  $\beta$  1,4 glikozid bağları ve fosfodiester bağlar ile bağlanmasıyla meydana gelir. Ayrıca peptidoglikan yapısında diğer hücre duvarı olan bakterilerdekinden farklı olarak, asetillenmiş muramik asit yerine, glikozillenmiş muramik asit ve diaminopimelik asit bulunur. İçerdiği diaminopimelik asit aracılığı ile lizozimden etkilenmez (Gülay, 2003; Köksal ve Yaman, 2003).



**Şekil 3.** Mikobakteriyel Hücre Duvar Yapısı (Alp; 2010).

### ***Lipidler***

Mikobakterilerin hücre duvarının en dış ve en kalın tabakasını oluşturur. Hücre duvarının %60'ını oluşturan lipid tabakasının yapısında; mikolik asitler, glikolipidler, mikosidler, fosfolipidler ve balmumu (Wax D) bulunur (Goren, 1972).

### ***Mikolik Asitler***

Mikolik asitlerde bulunan siklopropan halkaları MTB duvar kompleksinin yapısal bütünlüğüne katkı sağlar ve basili oksidatif strese korur. Aynı zamanda basilin konak makrofajları içinde yaşamasına ve immün sistemin zararlarından korunmasına da olanak sağlar. Bu nedenle mikolik asitlerin yapısı bakterilerin olumsuz koşullardaki davranışını belirler. Mikolik asitlerin dağılımı ve ince yapısı, MTB'nin virülanslığını belirler. Mikolik asit sentezi INH gibi bazı anti tüberküloz ilaçlar için bir hedefdir.(Takayama ve ark., 2005).

### ***Glikolipidler***

Bakterilerin virülansı ile ilgisi olduğu ilk olarak *Clostridium tetani*, *C. diptheriae* ve *C. botulinum*'da ortaya konmuştur. Virülans ile ilgili olduğu düşünülen



ve en fazla araştırılan glikolipidler, lipo arabinomannan (LAM) ve trehalozlar (kord faktör, sülfolipid, mikolipenik asit)'dir (Goren, 1972; Erturan, 2010).

### ***Lipo Arabinomannan (LAM)***

MTB'in en önemli virulans faktörlerinden birisidir. Hücre duvar yapısının %40'ını oluşturur (Abebe ve ark., 2007). Makrofaj inaktivasyonu ve oksidatif radikallerin ortadan kaldırılmasında rol oynar. Konağın immun sisteminin verdiği cevaplar sonucu oluşan T-hücre artışı, makrofajların aktivasyonu ve interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) artışı gibi tepki mekanizmaları ile birlikte, protein kinaz C'yi inhibe edip etkilerini azaltmak suretiyle bakteriye koruma sağlar (Guérardel ve ark., 2003; Knutson ve ark., 1998; Chan ve ark., 1991).

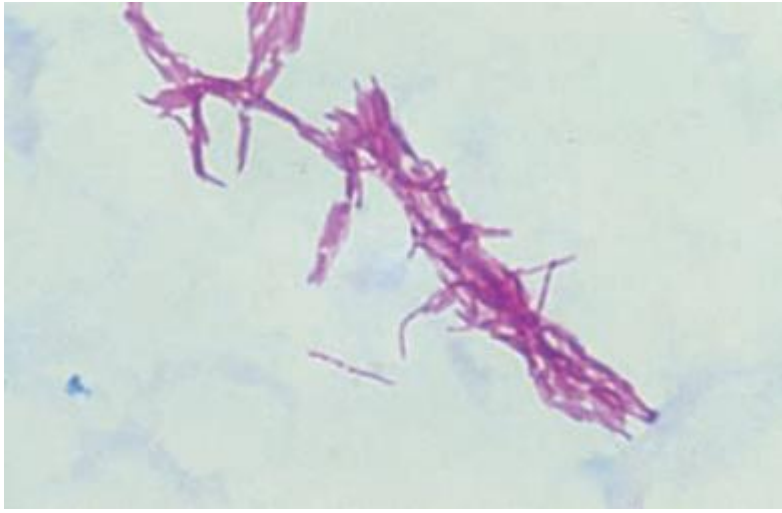
### ***Trehalozlar***

#### ***Kord Faktör***

Gardner Middlebrook'un, 1947 yılında, virulan MTB suşlarının mikroskopisinde, karakteristik olarak Şekil 4'teki gibi kıvrımlı, şerit şeklinde yapılar (kord faktör) görmesiyle ortaya çıkmıştır. Hubert Bloch, hafif organik çözücü yardımıyla canlı organizmaları ayırarak, onların yüzeylerinden glikolipid yapıdaki kord faktörü elde etmiştir. Daha sonra 'trehaloz-6,6'-dimikolat' olarak adlandırılan kord faktörün, mikobakterilerin virulansı ile ilgili olduğu ortaya çıkmıştır (Hunter ve ark., 2006).

Kord faktör, disakkarit yapılı trehaloz şekerinin iki mikolik asit ile esterlenmesi ile meydana gelir. Buradaki ester bağları, kord faktörün toksik etkisinin oluşumunda önemlidir (Gil ve ark., 2010; Kato, 1970). Virulan olan MTB suşlarında bulunur. Virulan olan MTB suşları, kord faktör üretebilme yeteneğini kaybederse, virulan özelliğini de kaybeder (Hunter ve ark., 2006). MTB suşlarının hücre duvarı yüzeyinde bulunan kord faktör, konağın savunma sistemindeki makrofajların salgıladığı lizozimin öldürücü etkisinden korur (Indrigo ve ark., 2003). Ayrıca

interlökin-12 (IL-12), interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktör  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve makrofaj inflammatuvar protein-2 (MIP-2) gibi granülom oluşumunda rol oynayan önemli sitokinlerin üretimini de artırır (Indrigo ve ark., 2003; Roach ve ark., 2002). Özellikle IL-12 artışı ile birlikte, üretimi artan diğer sitokinlerin de etkisiyle T hücreler ve doğal öldürücü hücrelerin üretimini ve Th1 hücrelerinin olgunlaşmasını tetikler. IFN- $\gamma$  üretimi ve makrofaj aktivasyonunun gerçekleşmesiyle, MTB hücreleri etrafında granülom oluşumuna neden olur (Trinchieri, 2003; Bekierkunst, 1968; Magram ve ark., 1996; Yamagami ve ark., 2001).



**Şekil 4.** Kord Faktör (Engelkirk ve Duben-Engelkirk, 2008)

### ***Sülfolipid***

Middlebrook ve ark. (1947) tarafından, virulan mikobakteri bileşenleri aranırken keşfedilmiştir. En virulan özellikteki suşlarda sülfolipid üretimi, çoğu zaman görülmektedir. Sülfolipidler, fagozomal ve lizozomal zarların yapılarını bozarak lizozomal hidrolazları inaktif hale getirebilirler (Rousseau ve ark., 2003).

### ***Mikolipenik asit***

Sadece virulan özellikli suşlarda bulunarak lökosit göçünü engeller. Aynı zamanda, lökositler üzerinde toksik etkisi de vardır (Dubey ve ark., 2002).

### ***Mikosidler***

İmmunojenik ve toksik olmayan, koloni formu ile bakterilerin bakteriyofajlara duyarlılığını etkileyen yapılardır (Lackie, 2007).

### ***Fosfolipidler***

Birçok hücre zarının ana yapısını oluşturur. Aynı zamanda zardan metabolitlerin taşınmasında görev alır. Sitoplazmik membranın yapısını oluşturur (Lackie, 2007; Sareen ve Khuller, 1998; Crellin ve ark., 2013).

### ***Balmumu (Waxes D)***

Hücre duvar yapısında bulunur. Muramil dipeptid içinde adjuvan etkisi vardır. Tümör geriletici özellikte olup BCG aşısının bazı tümörler için geriletici immunoterapötik etkisinde rolü vardır (Zeytinli Oral, 2010; Arslan Güzel, 2005).

### ***Proteinler***

Hücre duvar yapısında bulunup hücre bölünmesinde etkili enzimlerin ve duvar polimerlerinin sentezi, atıkların hücre dışına atımı, por oluşumu ve antijenik özellik sağlarlar. Duvar yapısında bulunan başlıca proteinler; ısı şok proteinleri, lipoproteinler, sitoplazmik membrana bağlı ve salgılanan proteinlerdir (Yenibertiz, 2009; Ligon ve ark., 2012).

### ***Isı Şok (Heat Shock) Proteinleri***

Isı şok proteinleri (HSP), organizmalar için evrensel ve iyi korunmuş durumdadır. Bu proteinlerin ekspresyonu; hipoksi, besin azlığı veya oksijen radikallerinin bulunması gibi koşullarda artar. HSP'lerinin hücreyi koruyucu rolleri bulunur. Olumsuz koşullarda, hücresel dengeyi sağlar. Aynı zamanda lenfosit ve makrofaj aktivasyonu için antijen sunumunda da rol oynar (Bajaj ve Batra, 2012).

### ***Lipoproteinler***

Lipoproteinler, mikobakteriyel hücre duvarının oldukça önemli bir bölümünü meydana getirir. MTB genomunda ortalama 99 lipoprotein kodlanmaktadır. Ancak bunların henüz hiçbir fonksiyonu bulunamamıştır. Bu lipoproteinler, sitoplazmik zarı geçer. Bunlar, periplazma içi yapılara bağlanır; ancak bazıları ise dış zara bağlanır. Taşıma, hücre duvarı metabolizması, hücre adezyonu, sinyalizasyon ve protein yıkımı gibi birçok hücre fonksiyona katıldıkları düşünülmektedir. Bu durumda, bazı lipoproteinler mikobakteri virulansında önemli rol oynar (Nyugen ve ark., 2009).

### ***Membrana Bağlı ve Salgılanan Proteinler***

Mikobakterilerde çoğu patojen bakteride olduğu gibi, hücre yüzeyindeki ya da hücre dışına salgılanabilen proteinler, hastalık etkeni olabilmektedir. Bakterilerde proteinlerin hücre dışına salınabilmesi için Sec yolu dahil olmak üzere, birçok farklı yol bulunur. Sec yolunda; mikobakterilerde 2 adet Sec A (SecA1 ve SecA2) proteini ve ayrıca membrana bağlı SecYEG translokonu bulunur. SecA2 proteini delesyona uğradığında, makrofaj içerisinde büyüme bozukluğu ve virulansında azalma olduğu görülmüştür (Hou ve ark., 2008).

### **2.3.2. İnsan Patojeni *Mycobacterium tuberculosis complex* Üyeleri**

İnsanlarda en sık görülen patojen mikobakteri türü MTB olup *Mycobacterium tuberculosis complex*, (MTBC) ailesinin üyelerinden birisidir. MTBC ailesi; MTB dışında, insanda patojen olan *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* ve *M. bovis* BCG gibi, 7 mikobakteri türünü daha içerir (Reddington ve ark., 2011).

### ***Mycobacterium tuberculosis***

İnsanlarda, en önemli ve en sık görülen TB etkenidir. İnsanlarda TB'un yaklaşık %95'inden sorumludur (Das ve ark., 2007). İlk olarak 1882'de, Robert Koch tarafından keşfedilmiştir (Sakula, 1982). Esas olarak, memelilerin akciğer ve

solunum sistemine yerleşir (Ryan ve Ray, 2004). Ayrıca *M. bovis*, *M. tuberculosis*'ten evrimleşmiş ve BCG aşısının yapımında kullanılmıştır (Lofthouse ve ark., 2013). Standart tedavisi için ilk 2 ay izoniyazid (INH), RIF, pirazinamid (PZA) ve etambutol (EMB) tedavi kombinasyonları uygulandıktan sonra 4 ay boyunca, INH ve RIF kombinesiyile tedaviye devam edilir (Blumberg ve ark., 2003).

### ***Mycobacterium africanum***

*M. africanum* ilk olarak, 1968 yılında keşfedildi (de Jong ve ark., 2010). *M. africanum* subgroup 1 ve *M. africanum* subgroup 2 olmak üzere, 2 farklı alt grubu bulunur. *M. africanum* subgroup 1, özellikleri bakımından *M. bovis*'e benzer ve en fazla Batı Afrika ülkelerinde görülür. *M. africanum* subgroup 2 ise özellikleri bakımından *M. tuberculosis*'e benzer ve en fazla Doğu Afrika ülkelerinde görülür (Frothingham ve ark., 1999). Tedavi için INH, RIF, PZA ve EMB kombinasyonları ile 2 ay boyunca kısa süreli tedavi sonrası, 4 ay boyunca INH ve RIF kombinasyonu kullanılır (Blumberg ve ark., 2003). *M. africanum*, MTB'den daha ciddi patolojik sorunlara yol açabildiği gibi, HIV pandemisi sırasında fırsatçı patojen olarak önem kazanabilir (Meyer ve ark., 2008).

### ***Mycobacterium canettii***

İlk olarak 1969 yılında, Fransız bir çiftçiden izole edildi (Fabre ve ark., 2010). Yüksek miktarda lipo oligosakkaritli hücre duvarına sahip olmaları durumunda, alışılanın dışında S tipi koloni oluşumu gözlemlenebilir (van Soolingen ve ark., 1997). *M. canettii*'nin doğru identifiye edilmesi, doğal PZA direncinin olup olmadığını görebilmek bakımından önemlidir. PZA direnci olan durumlarda, tedavi için ilk 2 ay boyunca INH, RIF, ve EMB kombinasyonları uygulandıktan sonra, 7 ay boyunca INH ve RIF kombinasyonu uygulanır (Blumberg ve ark., 2003).

### ***Mycobacterium bovis***

Besiyerinde *M. bovis* kolonilerinin gelişimi, *M. tuberculosis* kolonilerinin gelişimine göre daha hızlı olmaktadır (Karlson ve Lessel, 1970). Sığırlarda TB'un nedeni olmasına rağmen, birçok hayvanda da tespit edilmemiştir. *M. bovis*, insanlara

zoonotik olarak geçer (Hlavsa ve ark., 2008). Doğal PZA direnci olup olmadığının tespiti, kliniği açısından önemlidir. Tedavisi için ilk 2 ay INH, RIF ve EMB ve daha sonraki 7 ay boyunca, INH ve RIF kombinasyonu kullanılır (Blumberg ve ark., 2003).

### ***Mycobacterium bovis* BCG**

Bu suş, günümüzde aşı yapımında zayıflatılmış olarak kullanılır. Aşı, Fransız hekim Albert Calmette ve yardımcısı veteriner Camille Guerin tarafından üretilmiş olup, ilk kez 1921 yılında insanlar üzerinde kullanıldı. Bulunan bu aşı, Dünya çapında kullanılmış olup, verimliliği %80'e kadar çıkmaktadır (Fine ve ark., 1999; Albert Calmet, 3 Mart 2013). Her ne kadar verimliliği yüksek olsa da immun sistemi baskılanmış hastalarda ve çocuklarda, hastalığa sebep olmaktadır (Hesseling ve ark., 2006; WHO, 3 Mart 2013). Tedavisi için ilk 2 ay INH, RIF ve EMB kombinasyonlarını takiben, sonraki 7 ay, INH ve RIF kombinasyonu ile tedaviye devam edilir (Blumberg ve ark., 2003).

### ***Mycobacterium caprae***

TB etkeni olarak ilk kez keçilerde bulundu (Aranaz ve ark., 1999). *M. caprae*, keçi dışında, sığır da dahil olmak üzere bir çok hayvanda bulunabilir (Prodinger ve ark., 2002). Zoonotik yollarla bulaş, ilk kez, Hırvatistan'da 13 yaşındaki bir erkek çocukta görüldü (Cvetnic ve ark., 2007). 1999 ile 2001 yılları arasında, Almanya'daki TB vakalarının 3'te 1'inden sorumludur (Kubica ve ark., 2003). Genetik olarak *M. bovis*'e yakın olsa da *pncA* geninde nokta mutasyon olmaması sebebiyle, PZA'e duyarlı kabul edilmektedir. Tedavisi için 2 ay boyunca INH, RIF, PZA ve EMB kombinasyonları ve sonraki 4 ay boyunca, INH ve RIF kombinasyonu ile tedavi uygulanır (Niemann ve ark., 2002; Blumberg ve ark., 2003).

### ***Mycobacterium microti***

İnkübasyon süresi, laboratuvar koşullarında, en az 8 haftadır. Boyalı mikroskopisine bakıldığında, oldukça kavisli-C benzeri koloniler görülür (de Jong ve

ark., 2009). İlk defa, vahşi tarla farelerinde tespit edilmiş ancak memelilerde de TB'a neden olabildiği görülmüştür. Bağışıklık sistemi baskılanmış-yetersiz olsun ya da olmasın- herkeste görülebilir (Cavanagh ve ark., 2002; van Soolingen ve ark., 1998). *M. microtii*'nin identifikasyon yöntemiyle, diğer MTBC üyelerinden ayırmak oldukça zordur. Bu sebeple, moleküler tabanlı testler kullanılması gerekir (van Soolingen ve ark., 1998). Tedavi için ilk 2 ay INH, RIF, PZA, EMB kombinasyonları sonrası, 4 ay boyunca, INH ve RIF kombinasyonu uygulanır (Blumberg ve ark., 2003).

### ***Mycobacterium pinnipedii***

Fok balıklarında TB etkeni olup, eğitimlerinde de görülebilmektedir. 2003 yılında yapılan genotipik ve fenotipik araştırmalar sonrası *M. bovis* ve *M. tuberculosis*'den farklı bir olduğu anlaşılmış ve şimdiki adına kavuşmuştur (Cousins ve ark., 2003). Tedavisi için 2 aylık INH, RIF, PZA ve EMB kombinasyonları sonrasında, 4 ay boyunca, INH ve RIF kombinasyonu uygulanır (Blumberg ve ark., 2003).

## **2.4. Tüberkülozun Bulaşması ve Patogenezi**

### **2.4.1. Bulaşma**

TB için en önemli ve en sık rastlanan bulaşma yolu, aktif hasta olan bir kişinin öksürmesi, hapşırması, konuşması vb. durumlarda, hastalığı taşıyan damlacıkları dışarı atması sonucu, inhalasyon ile olur. Hasta ile yakın temas ve temas süresinin uzunluğu, hastalığın bulaşma potansiyelini artırır. Ayrıca aside dirençli bakteri (ARB) boyama pozitif ve larinks tüberkülozu gibi öksürük/aksırık oluşturacak şekilde olan hastalık durumlarında bulaştırıcılık düzeyi en üst seviyeye çıkar (Özkara ve ark., 2003).

Hastaların bulaştırıcılığının ve bakteri bulaşıcılığının azaltılabilmesi için etkili ve doğru tedavi, önemlidir. ÇİD-TB da aynı şekilde bulaşıcı olduğu için tedavi doğru uygulanmazsa ve ya etkisiz olursa, hasta bulaştırıcılığı ve bakterinin de bulaşıcılığı aynı şekilde devam eder. Uygun ve etkili uygulanan tedavi ile basil sayısı yanı sıra,

hastanın öksürük/aksırık sayısı da azalacağı için hastalığın bulaşma riski de oldukça azalacaktır (Özkara, 8 Mart 2013; Özkara ve ark., 2003).

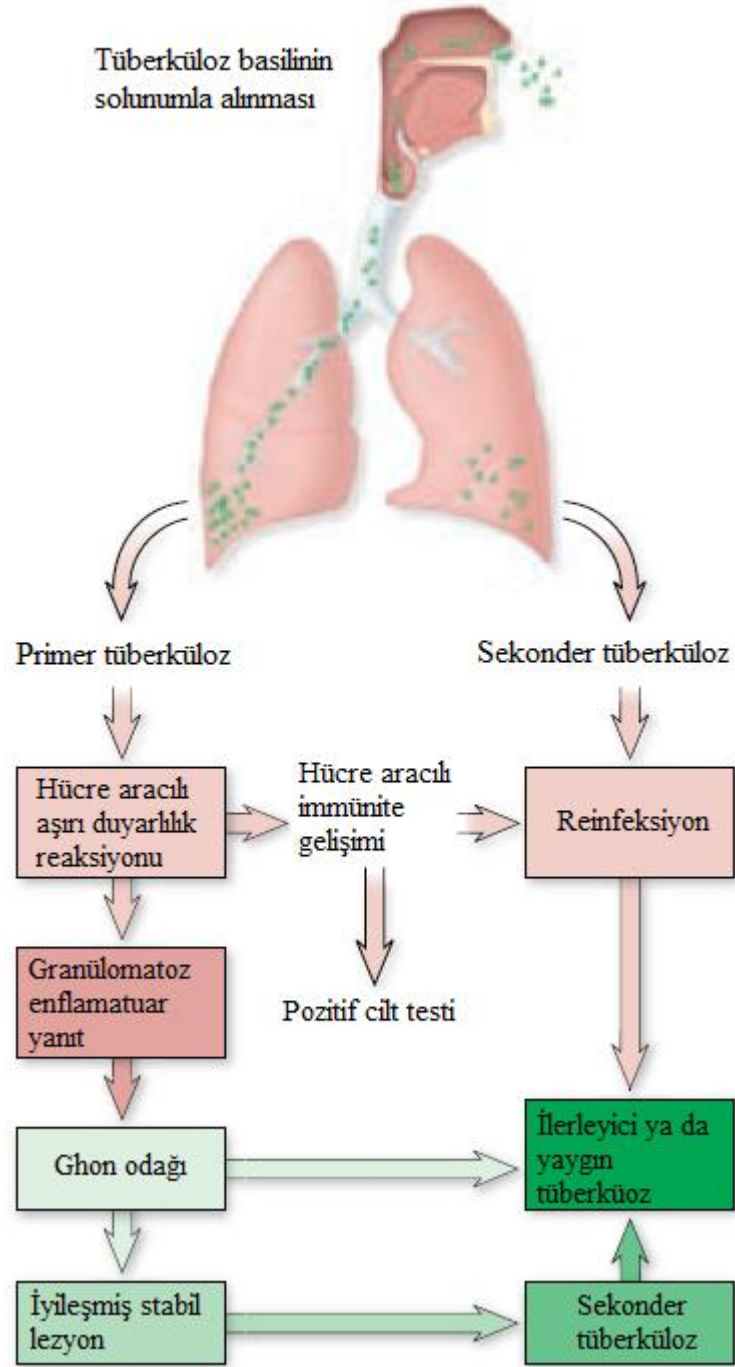
#### **2.4.2.Patogenez**

Aksırık/öksürük vb. yollarla dış ortama yayılan ve TB basili bulunduran zerrecikler, akciğerlere girerek alveoller içerisine yerleşir (Onur, 2009). Daha sonra, alveolar makrofajlar aracılığıyla fagosite edildikten sonra hücre duvar yapısında bulunan lipo arabinomannan tipi olan ManLAM, makrofajları etkisiz hale getirerek MTB'in yaşamasını sağlar. Glikolipidler, kompleman ve fiziksel-kimyasal etkilere direnç sağlar. Fagozom-lizozom birleşimi engellenerek ya da fagolizozom oluşursa; lizozomal enzimlere direnç geliştirilmesi, düşük pH'nın nötralize edilmesi, reaktif oksijen ara ürünleri etkisinin katalaz peroksidaz ya da alkil-hidroperoksidaz aracılığıyla ortadan kaldırılması, fagolizozomdan kaçış, CD1 baskılanması gibi yollarla kendisini koruyarak, hücre içerisinde ya latent olarak kalır ya da çoğalma başlar (Öztürk, 2003, Raja, 2004; Toossi ve Ellner, 1998; Özkara, 8 Mart 2013; Özkara ve ark., 2003).

Basillerin makrofajlara yerleşmesinden birkaç hafta sonra, lenf bezlerine antijenler taşınmaya başlar. Şekil 5'te görüldüğü gibi enfekte makrofaj ve dendritik hücreler; sitokinler ve kemokinler salgılayarak, bölgeye T lenfositler ile fagositleri çeker; granülom oluşumu ve makrofaj aktivasyonunu sağlarlar. Salgılanan sitokinlerden IL-12 ve TNF- $\alpha$ ; yardımcı T lenfositlerin (CD4<sup>+</sup>T<sub>H</sub>), T Helper-1 (T<sub>H</sub>1) yardımcı hücrelere dönüşmesini sağlar. T<sub>H</sub>1 lenfositlerden; IL-2, TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  salgılanır. Salgılanan IFN- $\gamma$ , makrofajları aktive edip IL-12 ve TNF- $\alpha$  senteziyle birlikte, fagositoz hızını artırır. Ayrıca salgılanan sitokinlerden IL-2 ve TNF- $\alpha$ , sitotoksik T lenfositleri (CD8<sup>+</sup>T<sub>C</sub>) ile doğal öldürücü (NK) hücrelerini aktive ederek enfekte makrofajları tespit ederek öldürür (Nicod, 2007; Özbal, 2006).

Primer ve sekonder olmak üzere 2 tip TB görülür.





Şekil 5. Tüberküloz hastalığının oluşum evreleri (Braun ve Anderson, 2007).

#### 2.4.2.1. Primer Tüberküloz Enfeksiyonu

TB basili ile herhangi bir şekilde daha önce karşılaşmamış bireyin, ilk defa basille karşılaşması sonucu, enfekte olması durumudur. Soğuk algınlığına benzer

semptomlar görülse de %90-95'i, asemptomatiktir. İnhalasyon yoluyla birey tarafından ilk defa alınan basiller, akciğerde, plevra altına yerleşerek makrofajlarca fagosite edilir. Fagosite edilen basiller, makrofajlarca tamamen yok edilebildiği gibi, makrofajların hücre-içi öldürmede etkisiz kalması nedeniyle, üremeye de başlayabilir. İlerleyen zaman içerisinde, TB basillerinin sayısı arttıkça, ilk önce Langerhans dev hücreleri oluşur; daha sonra bu kısımların T lenfositlerce çevrilmesi sonucu, granülom (tüberkül) olarak adlandırılan TB lezyonu meydana gelir. Oluşan lezyonda çoğalan basiller, en yakın lenf bezlerinde, lenfadenit oluşturur. Meydana gelen bu primer lezyon ve lenfadenit, birlikte Şekil 5'te olduğu gibi 'Gohn odağı' (primer kompleks) olarak adlandırılır. Daha sonra, lenfatik yolla organizmaya yayılarak akciğer apekslerinde Simon odaklarını, beyin ve meninkslerde Rieb odaklarını, damar iç kısımlarında Weigert odaklarını oluştururken; kemik, böbrek, dalak, karaciğer, böbreküstü bezi ve seröz zarlara yerleşen basiller ise sekonder TB enfeksiyonu oluşturmak üzere, stabil hale geçer (Sevim, 2007; Kalaycıoğlu, 1994).

#### **2.4.2.2. Sekonder Tüberküloz Enfeksiyonu**

Bireyin primer TB enfeksiyonunu atlattığı sonrasında, yıllar sonra, TB enfeksiyonunun tekrar ortaya çıkması durumudur. Aynı zamanda, 'post primer tüberküloz' ya da 'erişkin tipi tüberküloz' adı ile de bilinir. Endojen re-aktivasyon ya da ekzojen re-infeksiyon olarak, 2 farklı şekilde ortaya çıkar (Sevim, 2007; Kalaycıoğlu, 1994).

##### ***Endojen Re-aktivasyon***

Primer enfeksiyon esnasında, tüm organizmaya yayılmış haldeki stabil basillerin, yeniden aktive olmasıyla oluşur. Primer odağa yakın olan lenf bezindeki basillerin, yeniden re-aktivasyon ile bronşa açılması ya da lenfohematojen yolla akciğer apeksinde lezyon oluşturması ve Simon odağı gibi oluşmuş odak noktalarından yeniden aktivasyon ile ortaya çıkabilir (Sevim, 2007; Kalaycıoğlu, 1994).

## ***Ekzojen Re-enfeksiyon***

Primer enfeksiyon geçirmiş bireyin, dışarıdan tekrar gelen farklı bir basil ile yeniden hastalanması sonucu oluşan enfeksiyondur. Daha çok, erişkin dönemde ve sık görülür (Sevim, 2007; Kalaycıoğlu, 1994).

1990-2012 yılları arasında meydana gelen yeni olgu sayısının, Tablo 4'te görüldüğü gibi tekrar eden olgu sayısından daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

**Tablo 4.** Ülkemizde 1990 ile 2012 Yılları Arasında Yeni ve Nüks Eden TB Olgu Oranları (WHO, 10 Aralık 2013).

Yıl	Tekrarlayan ve Yeni Olgular	ARB pozitif	ARB negatif ya da Bilinmeyen	Akciğer Dışı Olgular	Diğer	Tekrarlayan	Nüks Harici Tedavi	Toplam Tedavi Edilen
1990	24.468	-	-	-	-	-	-	-
1995	22.981	4383	17534	1064	-	-	-	-
2000	18.038	4315	8544	4371	-	808	-	808
2005	19.744	7450	5944	5359	-	991	1559	2550
2010	15.879	5375	4191	5617	0	696	672	1368
2011	15.054	4927	3925	5565	0	637	625	1262
2012	14.139	4585	3829	5121	0	604	552	1156

## **2.5. Tedavi ve Direnç**

Tüberküloz, tedavisi için çağlar boyunca mücadele edilmiş ve hala daha edilmekte olan bir hastalıktır. TB için ilk tedavi, Galen tarafından M.S. 2. yüzyılda önerilmiş olup hastalara istirahat, öksürüğün kesilmesi ve diyet tavsiye edilmiştir (Kıter, 2000).

TB tedavisi için 1944'te, streptomisin (SM) keşfi dönüm noktası olmuştur. Fakat çok geçmeden enfeksiyonların tekrar etmesi sonucu ilaç direnci de ortaya çıkmıştır. 1950'li yıllardan itibaren; INH, PZA, tiasetazon, etionamid, protionamid ve EMB'un keşfedilmesiyle ayakta tedavi süreci başlamıştır. En son kemoterapi alanında değişiklik, 1966 yılında, RIF'in keşfi ve buna bağlı kısa süreli tedavi uygulanmaya başlanmasıyla olmuştur. Ancak bu umut verici gelişmeler, 1985

yılında, TB basiline HIV/AIDS ile birlikteliği ile beraber, daha dirençli olarak geri dönene kadar sürmüştür (Otkun, 2001).

Tüberkülozlu hastalar, verilen kombine ilaçları düzenli olarak ve yeterli süre kullanmaları sağlanabilirse, başarılı bir şekilde tedavi edilip sağlıklarına kavuşabilir. Tedavi esnasında "Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi" uygulanması da hastalığa yakalanan kişi sayısının azaltılabilmesi ve tedavi sürecinin başarıyla yürütülebilmesi açısından önemlidir. TB tedavisinde kullanılan ilaçlar; 'birinci seçenek ilaçlar" ve 'ikinci seçenek ilaçlar" olmak üzere iki tiptir. INH, RIF, PZA, EMB ve SM birinci seçenek ilaçlar olup ucuz, etkili, güvenilir, zararlı etkileri az olan ve bakterisid etkili ilaçlardır. Para Amino Salisilik asit (PAS), tiasetazon, protionamid, sikloserin, kanamisin ve kapreomisin ise ikinci seçenek ilaçlar olup düşük etkili, toksisitesi fazla, oldukça pahalı ve genellikle nüks eden ve dirençli tüberküloz vakalarında kullanılır (Bilgiç, 2003; T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (1), 22 Şubat 2013).

TB tedavi edilmediğinde ölüme sebep olabilen ve hızla yayılabilen bir hastalık olduğu için en kısa sürede tedavi edilmesi gereklidir. Muayene ve tedavi başlangıcında, özellikle ÇİD-TB olgularında; erken tanı konulamaması, birinci basamak hekimlerin yetersizliği, tedaviye ara verilmesi ya da terk edilmesi, transplantasyon veya HIV pozitifliğine bağlı immun sistem yetersizliği, sosyo-ekonomik durumun kötü olması gibi nedenler, tedavide istenilen sonucun alınmasını engelleyerek hastalığın daha fazla yayılmasına ve daha da dirençli hale gelmesine neden olabilir (Şengöz ve ark., 2004; Otkun, 2001; Deveci ve ark., 2003).

## **2.6. Klinik Materyallerin Uygun Şekilde Alınması ve Laboratuvara Ulaştırılması**

TB tanısının ve dolayısıyla tedavisinin doğru bir şekilde yapılabilmesi için materyallerin de uygun şekilde ve yöntemlerle alınarak laboratuvara ulaştırılması gereklidir.

Örneğin alımı ve laboratuvara ulaştırılması aşamasında dikkat edilmesi gereken bazı kurallar bulunur;

- a. Örnekler; temiz, steril kaplar içerisine ve mümkün olduğunca aseptik şartlar altında alınmalıdır.
- b. Örneğin alındığı kaplar; sızdırmaz, burgu kapaklı ve dayanıklı eğer enjektör içerisine alınacaksa luer tipi kapaklı olmalıdır.
- c. Mümkün olan en kısa sürede ve uygun koşullar altında, laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- d. Örneğin alındığı kabın üzerine ya da örnek ile birlikte gelen istem formuna, mutlaka hasta adı, protokol numarası ve örnek alınma tarihi yazılmalıdır.
- e. Özellikle ilk alınan örnek, tedaviye başlanmadan önce alınmalıdır.
- f. Alınan örnek hemen laboratuvara ulaştırılamayacaksa ya da işleme alınamayacaksa, kan örnekleri hariç 2 - 8<sup>0</sup>C'de saklanmalıdır.

Uygun olmayan kaplarda gelen, 24 saat boyunca biriktirilen, dondurulmuş örnekler gibi yukarıdaki özelliklere uygun olmayan örnekler, kabul edilmeden önce, ilgili doktor aranarak örneğin neden kabul edilmediği ile birlikte görüşülen kişinin adı ve görüşme tarihi not edilir. Kabul edilmeyen örnekler, tekrar örnek alınmaması durumuna karşı 2-8<sup>0</sup>C'de saklanır (Özkütük, 2003).

TB basili bakımından şüpheli materyaller, eğer başka bir laboratuvara nakledilecek ise DSÖ, uluslararası yasal düzenlemeler ve 'Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'nin zorunlu kıldığı üçlü kap sistemine uygun şekilde paketlenerek yollanmalıdır. Bu sisteme göre; birinci kap, içerisine materyal konulan, sızdırmaz cam/plastik ve burgu kapaklı kaplardır. Üzerine materyal ile ilgili bilgiler yazılmalıdır. İkinci kap, içerisine birinci kapların konulduğu sızdırmaz, dayanıklı ve birinci kaplardan oluşabilecek sızdırma olasılığına karşı sızan materyali emebilecek materyal içerirler. İkincil kapların üzerine gönderenin adı, telefonu ve adresi yazılmalıdır. Son olarak dış kap, tahta, sert plastik gibi maddeden yapılmış; içerisine ikinci kabın bulunduğu sert ve dayanıklı bir kaptır. Dış kap içerisine, ikincil kap haricinde, ayrıntılı örnek bilgileri ile birlikte soğuk zinciri sağlayacak materyaller konulur. En son dış kap üzerine; göndericinin ve alıcının adı, telefonları, adresleri yazıldıktan sonra 'biyolojik tehlike' etiketi yapıştırılmalıdır (Özkütük, 2003).

## 2.6.1. Akciğer Tüberküloz Örnekleri

### *Balgam*

Akciğer tüberkülozu tanısı için alınabilecek en uygun materyaldir. Boğaz florası bakterilerini de içerdiği için her ne kadar kontamine olsa da TB basili tespit edilme olasılığı en yüksek olan materyaldir. Üç gün boyunca arka arkaya, en az 3-5 ml olacak şekilde, özellikle ve mümkünse sabah balgamı, steril burgu kapaklı kap içerisine alınarak laboratuvara en kısa sürede verilir. Hasta balgam örneğini verirken, ağzını çalkalayıp derin nefes aldıktan sonra kuvvetlice öksürerek vereceği için başkalarına hastalık bulaştırma olasılıkları çok yüksektir. Bu sebeple, özel negatif basınçlı, ultraviyole (UV) ışık bulunan bir odada ya da açık havada bol güneş alan tenha bir yerde örneğin alınması tercih edilir (Özkütük, 2003; Ceyhan, 2010).

### *Bronkoskopik Lavaj*

Steril bir kap içerisine bronkoskopi esnasında alınan materyaldir. Alındığı gibi hemen işleme konulmalı ya da laboratuvara yollanmalıdır. Bir ml gibi az bir miktarda alınıp laboratuvara gönderilmiş olsa bile hemen işleme alınır (Özkara ve ark., 2003).

### *İndüklenmiş Balgam*

Hastanın balgam çıkaramadığı durumlarda, steril aerosol özellikli, %3-10'luk 10 ml tuzlu su, 5 ila 30 dk arası derince solutulduktan sonra akciğerlerce üretilen bu tükürük benzeri balgam yapısı, steril kaba alınır. Kap üzerine, tükürüğe çok benzediği için reddedilmesi riskini ortadan kaldırmak için 'indüklenmiş balgam' diye yazılarak laboratuvara yollanır (Günlüoğlu Şafak, 2004; Ceyhan, 2010).

### *Açlık Mide Suyu (AMS)*

Balgam çıkaramayan veya balgamını yutan hastalar, çocuklar ya da yeni doğan bebeklerden, başka yöntemlerle balgam alınamazsa, sabahleyin aç karna, açlık mide suyu (AMS) alınabilir. AMS, steril serum fizyolojik veya distile su kullanılarak

sonda yardımıyla alındıktan sonra yüzen balgam parçaları, vida kapaklı ve steril tek kullanımlık kaplara alınarak anında işleme alınır. Örnek hemen işleme alınamıyorsa, mide asidinin basillere zarar vermesini önlemek için örneğe bir damla bromtimol indikatörü damlatıldıktan sonra sarı rengi, yeşil-mavi renge dönene kadar %4 sodyum hidroksit eklenerek pH ayarı yapılmalıdır (Özkara ve ark., 2003).

## **2.6.2. Akciğer Dışı Tüberküloz Örnekleri**

### ***İdrar***

Verilen örnekler 40 ml'den az, 24 saatlik biriktirilmiş ya da bekletilmiş olmamalıdır. Steril bir kap içerisine sabah idrarı verilerek, anında laboratuvara ulaştırılmalıdır. İdrar, 3.000 devirde 15 dk santrifüjlendikten sonra çökelti kısmı dekontaminasyon yapıldıktan sonra işleme alınır (Özkara ve ark., 2003; Ceyhan, 2010).

### ***Aseptik sıvılar ve dokular***

Cerrahi ve aspirasyon teknikleriyle aseptik şartlarda alınan sıvı örneklerde basil sayısı az olduğu için 10-15 ml gibi yüksek hacimlerde, doku parçası gibi katı örnekler ise en az 1 gr olacak şekilde alınmış olmalıdır. Aseptik sıvılar pıhtılaşabilecekleri için sodyum polianetol sülfonat (SPS) ya da heparin eklenerek steril şekilde laboratuvara gönderilir. Aseptik dokular ise koruyucu, fikse edici maddeler ya da başka sıvılar içermeyen steril kaplara konularak laboratuvara yollanır (Özkütük, 2003).

### ***Dışkı***

Elli ml'lik steril ve tek kullanımlık polipropilen kapaklı, parafin içermeyen santrifüj tüpü içerisine 1-3 gr alındıktan sonra maksimum 2 saate kadar laboratuvara ulaştırılmalıdır. Steril serum fizyolojik ile 1 : 1 oranında karıştırılıp vortekslenir ve gazlı bez ile süzülerek işleme alınır. Dışkı kontamine bir materyal olduğundan, özellikle HIV pozitif hastalarda *Mycobacterium avium* kompleks izolasyonu için gereklidir (Özkütük, 2003; Ceyhan, 2010).

## **2.7. Tüberküloz Tanı Yöntemleri**

### **2.7.1. Klasik Yöntemler**

Klasik yöntemler; bakterilerin pigmentasyonu, koloni görünümü, biyokimyasal özellikleri, üreme hızı ve ısısı gibi özellikleri kullanılan yöntemlerdir. Çok fazla sayıda yeni moleküler yöntem geliştirilmiş olsa da aside dirençli bakteri (ARB) boyama mikroskopisi ve kültür yöntemleri ‘altın standart’ olarak tanıda hala önemini korumaktadır (Sürücüoğlu, 2006; de Waard ve Robledo, 2007).

#### **2.7.1.1. Aside Dirençli Bakteri (ARB) Boyama**

Mikobakteriler, oldukça yavaş üreyen bakterilerdir. Dolayısıyla erken tanıda, boyalı mikroskopi oldukça önemli bir yer tutar. TB basilleri, yüksek miktarda lipid içeren hücre duvar yapıları nedeniyle primer boya ile boyandıktan sonra asit-alkolle renk giderimine karşı dayanıklıdır. Tanı değeri, %90'ın üzerinde olup materyalin cinsi, personel deneyimi, mikobakteri türü vb. koşullara göre değişir. Karbol fuksin boyama veya florokrom boyama olarak, 2 farklı boyama yöntemi kullanılır (Narvaiz de Kantor ve ark., 1998).

##### **2.7.1.1.1 Karbol Fuksin Boyama**

Şekil 6'da gördüğümüz gibi karbol fuksin boyama Ziehl-Neelsen (sıcak) karbol fuksin boyama ve Kinyoun (soğuk) karbol fuksin boyama olarak 2 farklı şekilde yapılabilir:





**Şekil 6.** Karbol Fuksin Yöntemi ile Boyanan TB Basilleri (Ajobiewe ve Tiri, 2013).

#### **2.7.1.1.1.1. Ziehl-Neelsen Karbol Fuksin Boyama**

%95'lik 10 ml etanol içerisine 0.3 g bazik fuksin eklenir. Ayrıca 100 ml distile su içerisine, 5 g fenol kristalleri eklenir. Daha sonra, 100 ml fenollü suyun 10 ml'si dışarıya atılarak, ilk hazırlanan 10 ml bazik fuksin çözeltisi eklenip primer boya hazırlanır.

Renk giderici olarak %95'lik 97 ml etanol içerisine, 3 ml hidroklorik asit ilave edilerek hazırlanan %3 asit-alkol çözeltisi kullanılır.

Son olarak, 100 ml distile su içerisine, 0.3 g metilen mavisi ya da 1 g brilliant yeşili eklenerek zıt boya hazırlanır.

Hazırlanan ve fikse edilen yayma preparat üzeri, tamamen karbolfuksin boya ile kaplandıktan sonra alttan kaynamadan buhar çıkacak şekilde ısıtılır. Üç ile 5 dk arasında, ısıtma işlemine devam edilir. Isıtma işlemi bitince, lam soğuduktan sonra su ile yıkanır. %3 asit-alkol ile lam üzerinde boya akması durana kadar, renk giderimi yapılır. Lam, tekrar su ile yıkanır. Son olarak hazırlanan zıt boya ile 20 ila 30 sn boyanan preparat, tekrar iyice suyla yıkanarak kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra 100'lük objektifle incelenir (Sarigüzel, 2006).

### **2.7.1.1.1.2. Kinyoun Karbol Fuksin Boyama**

%95'lik 20 ml etanol içerisine, 4 g bazik fuksin eklenir. Ayrıca 100 ml distile su içerisine, 8 g fenol kristalleri eklenir. Daha sonra, hazırlanan 100 ml fenollü su ile 20 ml bazik fuksin çözeltileri karıştırılarak primer boya hazırlanır.

Renk giderici olarak %95'lik 97 ml etanol içerisine, 3 ml hidroklorik asit ilave edilerek hazırlanan %3 asit-alkol çözeltisi kullanılır.

Son olarak, 100 ml distile su içerisine, 0.3 g metilen mavisi ya da 1 g brilliant yeşili eklenerek zıt boya hazırlanır.

Hazırlanan ve fikse edilen yayma preparat üzeri, tamamen karbolfuksin boya ile kaplanır. İki dk boyunca, boyama işlemine devam edilir. Boyama işlemi bitince lam, su ile yıkanır. %3 asit-alkol ile renk giderimi yapılır. Lam, tekrar su ile yıkanır. Son olarak, hazırlanan zıt boya ile 20-30 sn boyanan preparat, tekrar iyice suyla yıkanarak kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra 100'lük objektifle incelenir (Sarigüzel, 2006).

### **2.7.1.1.2 Florokrom Boyama**

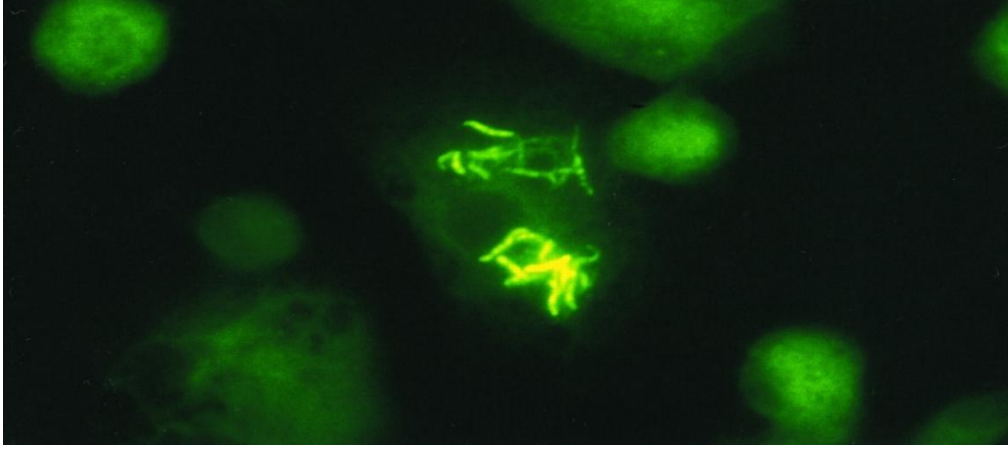
On ml fenol eklenmiş 50 ml distile su içerisine sırasıyla 1.5 g auramin O ve 0.75 g rhodamin B eklenerek hazırlanmış çözeltiliye en son 75 ml gliserol eklenerek fluoressan boya hazırlanır.

Renk giderici olarak 99.5 ml %70'lik etil alkol içerisine, 0.5 ml hidroklorik asit ilave edilerek hazırlanan solüsyon kullanılır.

Zıt boya olarak 100 ml distile su içerisine, 0.5 gr potasyum permanganat eklenerek hazırlanan çözelti kullanılır.

Hazırlanan ve fikse edilen preparatların üzeri, Auramin-Rhodamin (AR) boyası ile tamamen kaplanarak 15-20 dk kadar beklenir. Distile su ile iyice yıkandıktan sonra %0.5 asit-alkol içerisinde, 2-3 dk bekletilerek renk giderimi işlemi

yapılır. Tekrar distile su ile yıkanıp, hazırlanan zıt boya ile 2 dk boyunca boyanır. Distile su ile tekrar iyice yıkanarak kurutulduktan sonra 25'lik ya da 40'lık objektifle incelenir ve Şekil 7'deki gibi bir görüntü elde ederiz (Avkan Oğuz, 2006).



**Şekil 7.** Florokrom boyama yöntemiyle boyanmış TB basilleri (Zhang ve ark., 1998).

### **2.7.2.Kültür Yöntemleri**

Mikobakterilerin kültürü için alınan materyallerin çoğu, organik artıklar ve normal flora bakterileriyle kontamine durumdadır. TB basilinin kültür ile izole edilebilmesi, TB tanısı için 'altın standart' olarak önemini korumaktadır. Kültür işlemi yapılmadan önce, bu organik artıklar ile mikobakteri dışı diğer bakterilerin, alınan materyalden uzaklaştırılması gereklidir. Bunun için homojenizasyon/dekontaminasyon teknikleri kullanılır. N-asetil-L-sistein-Sodyum hidroksit (NALC-NaOH), sodyum hidroksit (NaOH), zefiran-trisodyum fosfat (Z-TSP), okzalik asit ve setilpiridinyum klorid (CPC)-sodyum klorid olmak üzere 5 farklı homojenizasyon/dekontaminasyon tekniği vardır. Bu tekniklerden en çok tercih edilip kullanılanı NALC-NaOH yöntemidir (Yajko ve ark., 1993; Cheepsattayakorn ve Cheepsattayakorn, 2006; Başkesen ve ark., 2010).

NALC-NaOH içerisindeki N-asetil-L-sistein (NALC), oldukça etkili bir mukolitik olup, oldukça kısa sürede balgamdaki mukus tabakasını parçalayabilir. Sodyum hidroksit ise dekontamine edici ve bakteri öldürücü (bakterisid) etkilidir (Bradner ve ark., 2013; Şanlıdağ ve Akçalı, 2009).

Gelen materyal, polipropilen vida kapaklı, 50 ml'lik steril ve dibi konik tüplere aktarıldıktan sonra üzerine, materyal miktarı kadar NALC-NaOH çözeltisi eklenir. Eğer gelen materyal 10 ml üzerindeyse en iltihaplı, kanlı ve mukuslu kısmı tercih edilerek 10 ml alınır. Yaklaşık 30 saniye vortekslelendikten sonra ara ara çalkalamak suretiyle, 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Onbeş dakika sonunda, tüpün 50 ml çizgisine kadar fosfat tamponu ilave edilip iyice karıştırılarak nötralizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra 3.000 devirde, 15 dakika kadar santrifüjlenir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant kısım, sodyum hipokloridli kaba dökülür. Kalan pelet kısmına, 1-2 ml fosfat tamponu ya da %0.2 sığır albümini fraksiyon V ilave edildikten sonra katı ya da sıvı kültür işlemi ve boyalı mikroskopi yayması yapılır (Ersöz, 2006).

#### **2.7.2.1.Katı Kültür Yöntemleri**

Agar bazlı ve yumurta bazlı olmak üzere, 2 tiptir. Tablo 5'te belirtildiği gibi selektif özellikte olmayan Petraghani ve American Thoracic Society besiyerleri ve L-J besiyeri, kullanılabilen yumurta bazlı besiyerleridir. Yine Tablo 5'te belirtildiği gibi seçici olmayan agar bazlı ve en çok kullanılmakta olan besiyerleri, Middlebrook 7H10 ile Middlebrook 7H11'dir. Ayrıca bunların dışında, Tablo 6'da belirtildiği gibi selektif özellikli L-J Gruft, Mycobactosel L-J gibi antibiyotik ve antifungal içeren besiyerleri de kullanılmaktadır.

Dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi sonrası elde edilen peletten, steril pipet ile besiyeri üzerine damlatılarak tüm yüzeye yayılacak şekilde ekim yapıldıktan sonra kapakları hafif gevşetilir ve 37<sup>0</sup>C'de inkübe edilir. Agar bazlı besiyerlerine ekim yapılıyorsa, karbondioksit geçirgen bir torba içerisinde inkübe edilir. Üreme olmayan besiyerlerinde, 8 hafta sonrasında hala üreme yoksa negatif sonuç verilir (Avkan Oğuz, 2013; Başkesen ve ark., 2010).

Mikobakterilerin üretilmesinde, en çok yumurta bazlı olan Löwenstein-Jensen (L-J) besiyeri kullanılır. İçeriğinde tüm yumurta, tuzlar, gliserol, patates unu ve inhibitör olarak da malaşit yeşili içerir. L-J besiyeri içerisine sikloheksimid, linkomisin, nalidiksik asit eklenmesiyle Mycobactosel L-J; RNA, penisilin, nalidiksik asit eklenmesiyle de L-J Gruft seçici besiyerleri elde edilir

(Mikobakterilerin Ekolojisi ve Veteriner Hekimlikte Mikobakteriyoloji, 10 Nisan 2013; Denton, 2006; Kent ve Kubica; 1985).

**Tablo 5.** Mikobakteri Kùltüründe Kullanılan Seçici Olmayan Katı Besiyerleri ve İçerikleri (Della-Lata, 2007).

<b>Seçici olmayan besiyerleri</b>		
<b>Besiyeri</b>	<b>İçerik</b>	<b>İnhibe edici madde</b>
<b>Löwenstein - Jensen</b>	Koagüle tam yumurta, tuzlar, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili, 0.025g/100ml
<b>Petragnani</b>	Koagüle tam yumurta, yumurta sarısı, süt, patates unu, gliserol	Malaşit yeşili, 0.052g/100ml
<b>Amerikan Toraks Derneği</b>	Koagüle taze yumurta sarısı, patates unu, gliserol	Malaşit yeşili, 0.02g/100ml
<b>Middlebrook 7H10</b>	Tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, glikoz	Malaşit yeşili, 0.025g/100ml
<b>Middlebrook 7H11</b>	Tuzlar, vitaminler, kofaktörler, albümin, katalaz, gliserol, %0.1 kazein hidrolizat	Malaşit yeşili, 0.025g/100ml
<b>CHOC</b>	İsoVitaleX ve sığır hemoglobini ile zenginleştirilmiş hemolizli kanlı agar	

**Tablo 6.** Mikobakteri Kültüründe Kullanılan Seçici Katı Besiyerleri ve İçerikleri (Della-Lata, 2007).

Seçici besiyerleri		
Besiyeri	İçerik	İnhibe edici madde
<b>Gruft modifiyeli Löwenstein - Jensen</b>	Koagüle tam yumurta, tuzlar, gliserol, patates unu, RNA (5 mg/100ml)	Malaşit yeşili, 0,025g/100ml; Penisilin, 50 U/ml; Nalidiksik asit, 35 µg/ml
<b>Mycobactosel Löwenstein - Jensen</b>	Koagüle yumurta, tuzlar, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili, 0,025g/100ml; Sikloheksimid, 400 µg/ml; Linkomisin, 2µg/ml; Nalidiksik asit, 35 µg/ml
<b>Mycobactosel Middlebrook 7H10</b>	Tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, glikoz	Malaşit yeşili, 0,025g/100ml; Sikloheksimid, 360 µg/ml; Linkomisin, 2µg/ml; Nalidiksik asit, 20 µg/ml
<b>Seçici 7H11 (Mitchison besiyeri)</b>	Tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, glikoz, kazein hidrolizat	Karbapenisilin, 50 µg/ml; Amfoterisin B, 200 U/ml; Polimiksin B, 200 U/ml; Trimetoprim laktat, 20 µg/ml

#### 2.7.2.2. Sıvı Kültür Yöntemleri

Duyarlılık testleri, *in vitro* deneyler, stok suş subkültürleri yapımı ve inokulum yapımında kullanılır. En çok Dubos Tween albumin ve Middlebrook 7H9 kullanılır. Hızlı kültür sistemlerinde (BACTEC 460TB, BACTEC MGIT 960, VersaTREK, MB/BacT Mycobacterial Detection, Wampole ISOLATOR Tube, Septi-Chek AFB Biphasic Medium) temel besiyeri olarak Middlebrook 7H9 kullanılır. Middlebrook 7H9 besiyeri içeriğinde; amonyum sülfat, L-glutamik asit, sodyum sitrat, piridoksin, biotin, disodyum fosfat, monopotasyum fosfat, ferrik amonyum sitrat, magnezyum sülfat, kalsiyum klorid, çinko sülfat ve bakır sülfat bulunur. Kullanılan diğer sıvı besiyeri Dubos Tween albümin sıvı besiyerinin içeriğinde ise; tripticase, asparajin, potasyum hidrojen fosfat, sodyum fosfat, ferrik amonyum sitrat, magnezyum sülfat, kalsiyum klorür, çinko sülfat, bakır II sülfat, Tween 80, sığır albümini bulunur (Ersöz, 2006; Avkan Oğuz, 2013; Sung ve Collins, 2003).

### **2.7.2.2.1. BACTEC 460TB Radyometrik Sistem**

BACTEC 12B (Middlebrook 7H12) besiyeri kullanılır. Middlebrook 7H12 besiyeri; Middlebrook 7H9 besiyeri, sığır albümini, kazein hidrolizat, katalaz ve karbonları işaretlenmiş substrat birleşiminden oluşur. Mikobakterilerin üremesi esnasında ürettikleri karbondioksit gazındaki işaretli karbonu (<sup>14</sup>C) saptayarak kantitatif olarak sonuç verir. Ortalama inkübasyon süresi, MTB için 9 ila 14 gün iken tüberküloz dışı mikobakteriler için 1 haftadan daha kısadır. Antibiyotik duyarlılık testleri ve identifikasyon testleri de yapılabilmektedir (Della-Lata, 2007; Albay, 2009).

### **2.7.2.2.2. BACTEC MGIT 960 Otomatize Sistem**

Besiyeri olarak modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve indikatör içeren tüpler kullanılır. Kullanılan besiyeri Middlebrook 7H9; kazein pepton, glikozlu sığır albümini, katalaz, oleik asit, poli oksietilen stearat, polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, azosilin ve trimetoprim içerir. Kullanılan her tüpün dip kısmında, oksijene duyarlı fluoresan veren indikatör madde, mikroorganizmaların üreme esnasında ortamdaki oksijeni kullanmaları durumunda fuloresan vererek üreme olduğunu bildirir (Della-Lata, 2007).

### **2.7.2.2.3. VersaTREK (ESP Kültür Sistemi II)**

Kültür için besiyeri ihtiva eden Myco şişeleri kullanılır. Myco şişeleri; Middlebrook 7H9 broth, casitone, gliserol, sığır albümini, glikoz, oleik asit, katalaz, sodyum klorid yanı sıra Myco AS (polimiksin B, azlosilin, fosfomisin, nalidiksik asit, amfoterisin B) veya Myco PVNA (polimiksin B, nalidiksik asit, amfoterisin B, vankomisin) içerir. Kültür şişesi içerisindeki oksijen tüketim ve gaz değişim oranlarını tespit ederek üremenin olup olmadığını tespit eder. Sonuçlar, 6 hafta inkübasyon sonrası üreme olmazsa, negatif olarak çıkarılabilir (Della-Lata, 2007).

#### **2.7.2.2.4. MB/BacT Mikobakteriyel Saptama Sistemi**

Kültür işlemi için BacT/ALERT MP ve BacT/ALERT MB (kan) kültür şişeleri kullanılır. BacT/ALERT MP şişeleri; Middlebrook 7H9 broth, sığır albümini, katalaz, kazein, oleik asit, gliserol ve amaranth'ın yanı sıra kontaminasyon engelleyici amaçlı amfoterisin B, azlosilin, nalidiksik asit, polimiksin B, trimetoprim ve vankomisin içerir. BacT/ALERT MB (kan) kültür şişeleri ise; Middlebrook 7H9 broth, kazein, SPS, sığır albümini sodyum klorid, oleik asit ve saponin içerir. Sistem, mikroorganizmaların büyümesi sırasında açığa çıkan karbondioksitin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Kullanılan kültür şişesinin dibindeki gaz geçirgenliği olan kısımdan, mikroorganizma üremesi sonucu oluşan karbondioksitin geçişiyle şişenin dip kısmı, mavimsi yeşil renkten, sarıya döner (Della-Lata, 2007).

#### **2.7.2.2.5. Wampole ISOLATOR Tüp**

Her tüpte, hücre içerisinde bulunan mikobakterilerin hücre dışına çıkarılmasını sağlamak amacıyla saponin litik maddesi bulunur. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant kısmı atılıp, kalan pelet kısmından, istenilen L-J, Middlebrook vb. uygun besiyerine ekim yapılır. Her bir Wampole ISOLATOR tüp içerisinde; saponin, polipropilen glikol (saponin için köpük önleyici), sodyum poli etanol sülfat (antikoagülan), fluorinert ve EDTA bulunur (Della-Lata, 2007).

#### **2.7.2.2.6. Septi-Check AFB İki Fazlı Besiyeri**

Middlebrook 7H9 broth ve Middlebrook 7H11 agar; yumurta bazlı besiyeri, çikolatamsı besiyeri slaytlarından meydana gelir. Çikolatamsı besiyeri, *Mycobacterium haemophilum* kontaminasyonunu saptamada yardımcıdır (Della-Lata, 2007).

### **2.7.3. Moleküler Yöntemler**

TB'nin kontrol altına alınarak daha fazla yayılmasını engellemek ve olası salgınlara önüne geçebilmek için mümkün olan en kısa süre içerisinde ve en güvenilir şekilde tanısının konulabilmesi oldukça önemlidir. Moleküler yöntemler,



büyük bir hızla ilerleme ve gelişme göstererek, ileride mikroskopi ve kültür yöntemlerinin yerine kullanılabilir en kuvvetli alternatif olmalarına rağmen, hala daha duyarlılıkları ve özgüllükleri istenilen düzeylere ulaşamamıştır (Başkesen ve ark., 2010; Avkan Oğuz, 2013).

Moleküler yöntemleri kullanırken, yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuç olasılıkları düşünülerek her çalışmada, pozitif ve negatif kontroller ile çalışılmalıdır. Kültür ile birlikte mikroskopik incelemesi negatif olan hastaların örneklerinden yapılan moleküler testlerin sonuçlarında eğer pozitiflik tespit edilirse, mutlaka radyolojik bulgularla sonucu desteklemek gereklidir (Özkütük, 2003; Kocagöz, 2010).

TB tanısında moleküler yöntemler kullanılırken, çalışılacak materyalin işlenmesi oldukça önemlidir. TB'da, tanı için en çok kullanılan materyal balgam olup, akışkan olmayan yapısında, TB basili dışında daha birçok bakteri bulunur. Bu sebeple, TB basilini saf olarak elde edebilmek için dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi ile balgam örneği akışkan hale getirilir; diğer bakterilerin ölmesi sağlanır ve basillerin santrifüj ile tüp dibine toplanması sağlanır. Aynı zamanda, işlenen örneğin, 95-100<sup>0</sup>C kaynar su banyosunda bir süre bekletilmesi de elde edilen DNA miktarını artıracığından, kullanılan moleküler yöntemin duyarlılığı da artmış olur (Harris ve ark. 1993; de Waard ve Robledo, 2007; Cheepsattayakorn ve Cheepsattayakorn, 2006).

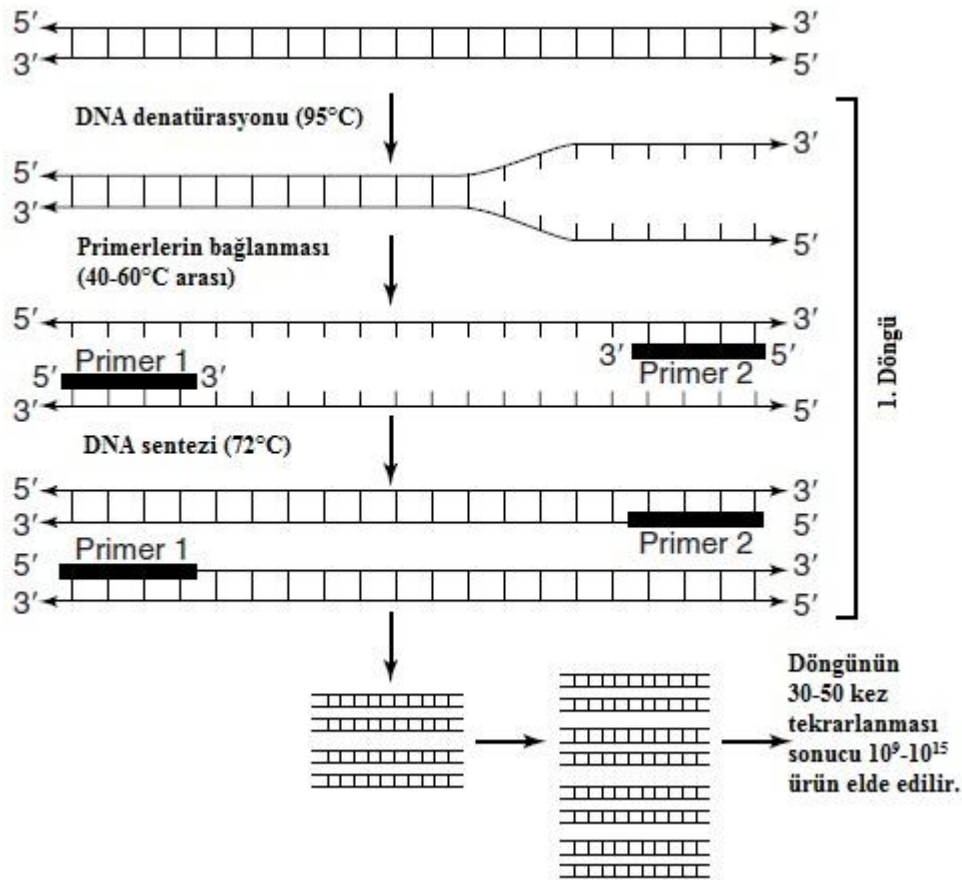
Polimeraz zincir tepkimesi (Polymerase Chain Reaction, PCR), zincir ayırma çoğaltması (Strand Displacement Amplification, SDA), transkripsiyon-aracılı çoğaltma (Transcription-Mediated Amplification, TMA), ligaz zincir tepkimesi (Ligase Chain Reaction, LCR), ilmik-aracılı çoğaltma (Loop-Mediated Amplification, LAMP) ve RT-PCR (İzlenebilir-PCR) en çok kullanılan moleküler yöntemler arasındadır.

### **2.7.3.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)**

Balgamda ve diğer materyallerde MTB tespiti için DNA amplifikasyonu, oldukça hızlı ve spesifik olup, formalin ile fikze edilmiş ya da parafin kaplı

örneklerde de kullanılabilir. DNA'yı çoğaltmak için kalıp DNA, çoğaltılacak bölgeyi tanıyan primerler, primerlere 3' uçtan bağlanıp nükleotit ekleyecek DNA polimeraz, deoksinükleotit trifosfatlar, tampon maddeler, tuzlar ve  $Mg^{++}$  iyonları içeren karışım hazırlanır.

Denatürasyon, bağlanma (annealing) ve polimerizasyon olmak üzere, 3 adımda, DNA çoğaltılması işlemi gerçekleşir. Şekil 8'de olduğu gibi çoğaltmanın ilk aşaması olan denatürasyonda; DNA,  $95^{\circ}C$ 'ye kadar ısıtılarak iki zincirinin birbirinden ayrılması sağlanır. İkinci basamak olan bağlanma aşamasında; sıcaklık  $40-60^{\circ}C$ 'ye düşürülerek primerlerin çoğaltılacak bölgeye bağlanması sağlanır. Son aşama olan polimerizasyonda ise ortam sıcaklığının  $72^{\circ}C$ 'ye getirilmesiyle DNA polimerazların primerlere bağlanarak 3' uçtan itibaren, yeni DNA sentezlemeleri sağlanır. Çoğaltılan DNA parçaları, poliakrilamid ya da agaroz jel üzerinde yürütülerek ve jel üzerinde yürütülürken etidyum bromür ile boyanması sonucu, UV ışığı altında gözlemlenebilir (Tarhan, 2002).



Şekil 8. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR) aşamaları (Kalof ve ark, 2010).

İdentifikasyonu zor olan, izole edilemeyen ve kültürü yapılamayan mikroorganizmaların tanımlanmasında, toksin üreten mikroorganizmaların toksinlerinin saptanmasında, dirençli bakterilerin ilaç dirençlerinin belirlenmesinde ve parazitoloji, viroloji, moleküler immunoloji ve epidemiyoloji gibi mikrobiyolojik çalışmalarda daha çok kullanılan bir yöntemdir (Yetilmezer, 2010).

### **2.7.3.2. Zincir Ayırma Çoğaltması (SDA)**

DNA amplifikasyonunda kullanılan *in vitro* ve izotermal bir yöntemdir. Amplifikasyon için DNA örneğini keserek 5' ve 3' uçlara sahip çoğaltılabilir parçalar haline getirebilecek restriksiyon enzimi gereklidir. Hedef DNA, ısı yardımıyla denatüre edilerek primerlere ayrılır. Değiştirilmemiş hemifosforotioat iplikçikleri (HincII) ve ekzonükleazı çıkarılmış klenow (exo-klenow) eklenerek 37<sup>0</sup>C'de bekletilir. Klenow parçası, bir DNA polimeraz olup *E. coli*'den elde edilir ve çift zincir DNA üzerinden kesilen tek zincirden, DNA sentezini sağlar (Walker ve ark., 1992).

### **2.7.3.3. Transkripsiyona Bağlı Çoğaltma (TMA)**

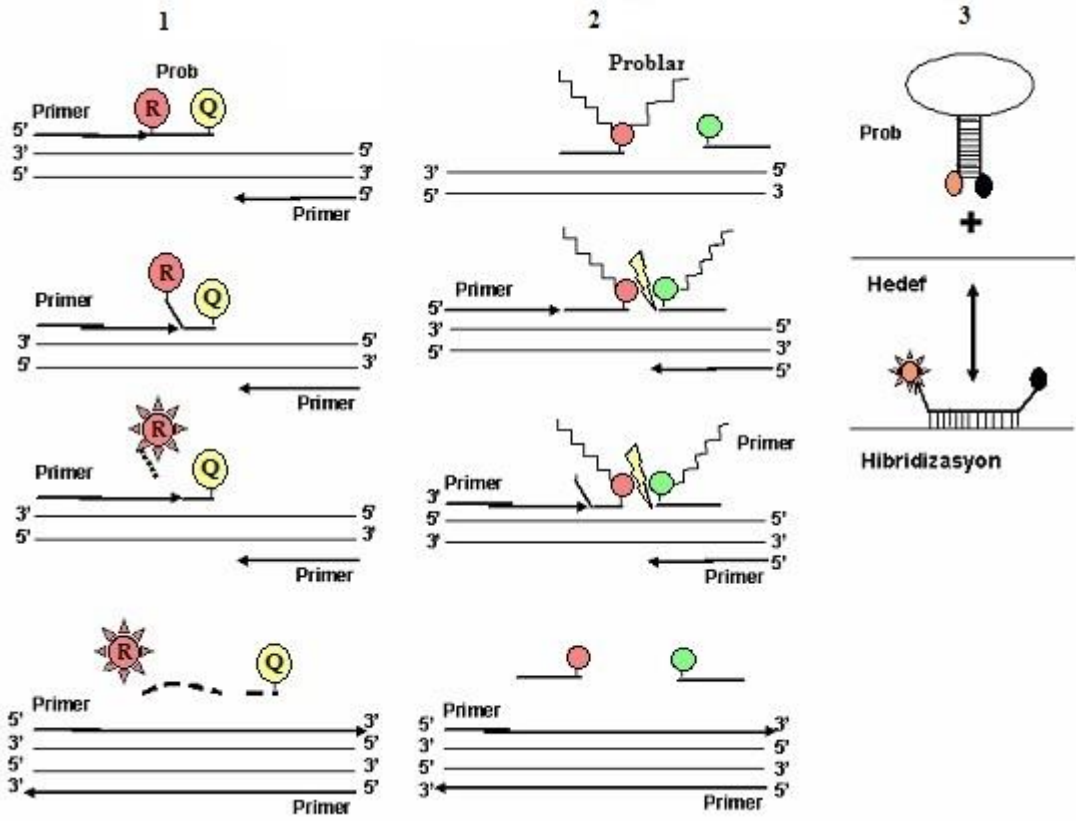
Hedef mikroorganizmanın ribozomal RNA'sı (rRNA) çoğaltıldıktan sonra revers transkriptaz aracılığıyla DNA kopyaları çıkarılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilir. rRNA'nın DNA kopyası çıkarıldıktan sonra DNA-RNA birleşimindeki RNA, revers transkriptaz aracılığıyla ortadan kaldırılarak tek zincirli DNA'yı meydana getirir. Ayrıca DNA polimeraz gibi işlev görebilen revers transkriptaz, ortamdaki diğer primer aracılığıyla çift zincirli DNA üretir. Rna polimeraz enzimi ile birçok RNA kopyası çıkarılır. Oluşan RNA'lar, kalıp olarak kullanılarak istenilen mikroorganizmanın DNA çoğaltması yapılmış olur (Tarhan, 2002).

#### **2.7.3.4. Ligaz Zincirleme Tepkimesi (LCR)**

İşlem için özgül oligonükleotitler ile birlikte, dNTP'ler ve termofilik DNA ligaz kullanılır. Tespit edilecek DNA'ya özgün olan hedef bir DNA bölgesi ile işaretlenmiş problar, biraraya konularak 94<sup>0</sup>C'ye ısıtılır. DNA, denatüre olduktan sonra 40-70<sup>0</sup>C'ye soğutularak işaretli problemlerin, hedef DNA'ya bağlanması sağlanır. Problar, birbirlerine 1-2 nükleotit boşluklu olarak bağlanır. Boşluklar, polimeraz enzimi aracılığıyla doldurulduktan sonra ligaz problemleri, kovalent olarak birbirlerine bağlanır. Aynı işlemin tekrar edilmesiyle amplifikasyon işlemi gerçekleştirilir (Türkoğlu, 1998; Tarhan, 2002).

#### **2.7.3.5. İzlenebilir Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR)**

Fluoresan veren DNA problemleri aracılığıyla amplifikasyonun takip edilebildiği ve aynı zamanda mutasyonların saptanabildiği bir sistemdir. MTB'in çoklu ilaç direncinde rol alan rpoB genindeki mutasyonunun saptanmasında kullanılır. Ekstraksiyon yapılacak koloni, Tris-EDTA içerisine karıştırılır. Üç kez yıkama sonrası, 20 dakika aynı buffer içerisinde kaynatıldıktan sonra santrifüjlenerek çökelti kısmında toplanan DNA kullanılır. PCR için 20 µl DNA master hibridizasyon problemleri, Şekil 9'da gösterilmiş olan Taqman yönteminde bulunan Taq polimeraz, deoksinükleosit trifosfat ve MgCl<sub>2</sub> içeren karışım hazırlanır. Primerler solüsyona eklendikten sonra elde edilen DNA'lar da eklenir. İlk aşamada, ortam sıcaklığı 95<sup>0</sup>C'ye çıkarılıp 1 dakika bekletilerek, denatürasyon işlemi gerçekleştirilir. İkinci aşamada, 95<sup>0</sup>C'de 5 saniye, 58<sup>0</sup>C'de 10 saniye ve 72<sup>0</sup>C'de 20 saniye olmak üzere, 45 defa amplifikasyon aşaması gerçekleştirilir. Üçüncü aşamada örnek, ilk olarak 95<sup>0</sup>C'de 30 saniye, daha sonra sıcaklık 5<sup>0</sup>C'ye indirilerek 2 dakika ve tekrar 95<sup>0</sup>C'ye çıkarıldıktan sonra hemen 40<sup>0</sup>C'ye soğutulup 30 saniye bekletilerek oluşan fluoresans aracılığıyla, direnç olup olmadığı ve istenilen DNA'nın elde edilip edilemediği anlaşılır (Kocagöz ve ark., 2005).



**Şekil 9.** Real Time PCR'da Kullanılan 1. Taqman 2. FRET ve 3. Molecular Beacon Prob Sistemleri (Çavuşoğlu, 2003).

### 2.7.3.6. İlmîğe Dayalı Çoğaltma (LAMP)

İzotermal amplifikasyon yöntemi olup, yüksek verimliliğe ve özgüllüğe sahiptir. Bu yöntem için hedef DNA üzerindeki 8 farklı bölgeye özgü 6 farklı primer dizisi ve DNA polimeraz enzimi kullanılır. Oldukça hızlı olup 60-70<sup>0</sup>C'de, 1 saat içerisinde bir kopyadan 10 kopya çıkarabilmektedir. Amplifikasyon sonrası elde edilen DNA örnekleri, etidyum bromürle boyanarak %1.5 agaroz jel üzerinde yürütülür (Kolören ve ark., 2010).

## 3.GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

Çalışma; Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür. Çalışma için materyal olarak Balıkesir-Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına, polikliniklerden primer tüberküloz şüphesiyle gönderilen ve klinik tanısı doğrulanan 96 hastadan alınan örnek kullanılmıştır.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Dekontaminasyon - Homojenizasyon

##### *N-asetil-L-sistein-sodyum hidroksit Yöntemi (NALC-NaOH)*

Dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemi için N-asetil-L-sistein (NALC), %2-4 NaOH ve %1.47 trisodyum sitrat x 3H<sub>2</sub>O çözeltisi içeren Mycoprosafe<sup>®</sup> solüsyonu (Salubris, Türkiye) kullanıldı.

Firma talimatları doğrultusunda alınan pulmoner örneğin hacmi kadar, sodyum hidroksit-trisodyum hidroksit çözeltisi, boncuk ve NALC içeren tüpe boşaltıldı. Tüpün ağzı sımsıkı kapatılarak, tamamen karışması sağlandı. NALC, boncuk ve sodyum hidroksit-trisodyum hidroksit içeren karışım, balgam tüpüne boşaltıldıktan sonra kapağı sımsıkı kapatıldı ve iyice vorteksledi. Vorteksleme sonrası örnek, 15 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra, tüp içerisine, 45 ml çizgisine kadar fosfat tamponu eklenip vorteksledikten sonra soğutmalı santrifüjde, 15 dakika boyunca, 3.000 devirde santrifüjlendi. Santrifüjleme işlemi sonrası

süpernatant kısım, boşalmış olan NALC tüpüne dökülerek, içerisine sodyum hipoklorit eklendi ve kalan pelet kısmın üzerine, 5 ml'ye tamamlanacak şekilde, fosfat tamponu eklenerek vortekslendi. Böylece mukolitik etkili NALC ve dekontaminant özellikli sodyum hidroksit yardımıyla pulmoner örnekler hızla eritilerek, işlem tamamlandı.

### **3.2.2. Ehrlich Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi**

#### ***Boyaların Hazırlanması***

##### ***Karbol Fuksin (Fenollü Fuksin)***

Bazik Fuksin (A.D.R., İstanbul)	1 gr
Fenol (A.D.R., İstanbul)	5 gr
%96'lık saf etanol (Necm Kimya, İstanbul)	10 cc
Distile su	100 cc

##### ***Asit-Alkol***

Konsantre HCl (%37'lik)	3 cc
%96'lık saf etanol (Necm Kimya, İstanbul)	97cc

##### ***Metilen Mavisi***

Metilen mavisi (toz) (MERCK, Almanya)	0.3 gr
Distile su	100 cc

##### ***Ehrlich Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi Uygulanması***

i) Dekontaminasyon homojenizasyon işleminden geçirilen örnekten temiz bir lam üzerine yayma preparat hazırlanır ve havada kurutulur.

ii) Üç kez alevden geçirilerek tespit edilir.

iii) Boyanacak alanın üzerine karbol fuksin dökülerek, alttan buhar çıkacak ama kaynamayacak şekilde ısıtılarak, 5 dakika boyunca boyanır.

- iv) Preparat soğuduktan sonra distile suyla boya akana kadar iyice yıkanır.
- v) Yıkama sonrası preparat, asit-alkol ile renksizleşene kadar daldırılıp çıkarılır.
- vi) Renk giderimi yapıldıktan sonra preparat tekrar yıkanır.
- vii) Metilen mavisi dökülerek, 1 dakika boyunca, boyama işlemi yapılır.
- viii) Distile su ile boya tamamen akana kadar yıkanır.
- ix) Preparat, eğik bir şekilde kurutularak incelenir. *M. tuberculosis*, pembe-kırmızı basil şeklinde görülür (Ceyhan, 2010).

### **3.2.3. Kültür**

#### **3.2.3.1. Katı Kültür**

Yapılacak kültür işlemi için Löwenstein - Jensen besiyeri (Salubris, Türkiye) kullanıldı. Örneklere dekontaminasyon - homojenizasyon işlemleri uygulandıktan sonra kalan pelet kısımlarından, steril pastör pipeti yardımıyla alınarak lam üzerine yayma preparat hazırlandı ve ARB boyama işlemi yapıldı. ARB boyama işlemi gerçekleştirilen örnekten besiyerlerinin üzerine 3-4 damla damlatılarak, tüm yüzeye yayılması sağlandı. Daha sonra besiyerlerinin kapağı tamamen sıkılıp, inkübasyon için etüve konuldu (Yüce, 2010)

#### **3.2.3.2. Sıvı Kültür**

Firma talimatları doğrultusunda dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi yapılmış olan örneklerin, kalan pelet kısımları kullanılarak ilk önce ARB boyama işlemi ve sonrasında ekim işlemi yapıldı. VersaTrek (TrekDS, Amerika) marka cihazın VersaTREKMyco (Thermo Scientific, Amerika) besiyeri, kapak kısmı %70 alkolle silindikten sonra steril enjektör yardımıyla, 1 ml VersaTREK Myco GS solüsyonu ve 0.5 ml VersaTrek Myco PVNA solüsyonları eklendi. Besiyeri, 2 dakika vorteksledikten sonra steril başka bir enjektör aracılığıyla, dekontaminasyon-homojenizasyonu ve ARB boyaması ile incelemesi yapılmış örneğin en dip kısmından 1 ml alınarak, besiyeri şişesine aktarım yapıldı. Pozitif olarak nitelendirilen besiyeri şişelerinden, steril enjektör yardımıyla örnek alınarak, tekrar



ARB boyaması yapılarak incelendi. ARB pozitif çıkan örneklerin MTB tiplendirmesi yapılarak, MTBC olduğu doğrulandıktan sonra ilaç duyarlılık testi yapıldı.

### **3.2.4. MTB Tiplendirme**

Kültür sonucu pozitif olan örnekler, tiplendirme ve anti-mikobakteriyel duyarlılık testi işlemine alındı. VersaTrek sıvı kültür yöntemiyle MTBC dışı atipik mikobakteriler de üretilebildiği için pozitif olarak nitelendirilen besiyeri şişesi, 2 dakika vortekslendikten sonra firma talimatları doğrultusunda içerisinde 100 µl örnek alınarak SD TB Ag MPT64 Rapid (Standard Diagnostics, Kore) kart testine damlatılarak, 15 dakika beklendikten sonra sonucu pozitif olarak değerlendirilen örnekler MTBC olarak değerlendirildi.

#### **3.2.4.1. Sıvı Kültürde İlaç Duyarlılık Testi**

Firma talimatları doğrultusunda 5 adet VersaTREK Myco besiyerinden alınarak hasta isimleri yazıldıktan sonra 4 tanesinin üzerine antibiyotiklerin isimleri, kalan 1 tanesine ise kontrol yazıldı. Liyofilize haldeki antibiyotikler, üretici talimatlarına göre sulandırıldı. INH, EMB ve RIF'den 0.5 ml; SM'den 1 ml olmak üzere enjektörlere çekildi. Hazırlanan 5 besiyeri şişesinin üzerleri batikon ile dekontamine edildikten sonra herbir şişe içerisine, 1 ml TREK Myco GS solüsyonu eklendi. Kontrol şişesine 0.5 ml steril distile su ve diğer şişelere, üzerlerine yazılan isimlerine göre antibiyotikler konuldu. Üreme olan şişe vortekslenerek, içerisinde 1 ml alınarak, üzerine 9 ml steril distile su eklenip 1:10 oranında dilüe edildi. Dilüe edilen örnekten, herbir şişe içerisine 0.5'er ml konulduktan sonra cihaza yerleştirildi. Kontrol şişesinde üreme olduktan sonraki 3 gün içerisinde, antibiyotik olan şişelerden üreme olanları 'dirençli', üreme olmayanları ise 'duyarlı' kabul edildi.

#### **3.2.4.2. Katı Kültürde İlaç Duyarlılık Testi**

TrekDS firma talimatları doğrultusunda Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen koloniler, steril öze yardımıyla bol miktarda ve 10 ml steril distile su bulunan vida kapaklı tüp içerisine alınarak, 2 dakika süre ile vortekslendi. Onbeş dakika bekletilerek, büyük parçaların dibe çökmesi sağlandı. Tüp yüzey kısmından, steril

Pastör pipetiyle, başka bir steril tüpe 5 ml alınarak, bulanıklığı 1 McFarland olacak şekilde, üzerine steril distile su eklendi. 1 McFarland bulanıklık oluşturulan tüpten, yine steril Pastör pipetiyle 1 ml alınarak, başka bir steril tüpe aktarıldıktan sonra üzerine 9 ml steril distile su ilave edilerek 1:10 oranında sulandırılma yapıldı. Daha sonra, 5 adet VersaTREK Myco besiyerinden alınarak, hasta isimleri yazıldıktan sonra 4 tanesinin üzerine antibiyotiklerin isimleri, 1 tanesine de kontrol yazıldı. Üretici talimatlarına göre sulandırılan liyofilize antibiyotiklerden INH, EMB ve RIF 0.5 ml; SM ise 1 ml olacak şekilde enjektörlere çekildi. Hazırlanan 5 besiyeri şişesinin kapak kısımları iyot solüsyonu ile dekontamine edilerek, her bir şişe içerisine, 1 ml TREK Myco GS solüsyonu eklendi. Kontrol şişesine 0.5 ml steril distile su ve diğer şişelere ise üzerlerindeki isimlere göre antibiyotikler konuldu. Hazırlanan 1:10 oranında sulandırılmış bakteri süspansiyonundan, kontrol şişesi hariç, diğer şişelere 0.5 ml eklendikten sonra kontrol şişesiyle birlikte tüm şişeler vortekslenerek, cihaza yerleştirildi. Kontrol şişesinde üreme olmasından sonraki 3 gün içerisinde, antibiyotik içeren şişelerden üreme olanları 'dirençli', üreme olmayanları ise 'duyarlı' kabul edildi.

### **3.2.5. Moleküler Yöntem**

Uygulanacak moleküler yöntemde, TB basilinin tespit edilme olasılığını artırmak ve yöntemleri kıyaslayabilmek amacıyla dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi uygulanmış hasta örnekleri kullanıldı. Kültüründe MTBC üretilmiş olan ve -86<sup>0</sup>C'de muhafaza edilmiş olan hasta örnekleri oda ısısında çözüldükten sonra işleme alındı.

Dibi konik, 10 ml'lik steril 16x100 etiketli kapaklı tüp içerisine firma talimatları doğrultusunda 2 ml Xpert MTB/RIF Sample Reagent konulduktan sonra üzerine 1 ml dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi yapılmış hasta örneğinden eklenerek, kapağı sıkıca kapatıldı.

Kapağı kapatılan tüp iyice vortekslenerek, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Daha sonra tekrar vortekslenerek, oda sıcaklığında 5 dakika daha bekletildi.

Vortekslenerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletilen tüpteki örneklerden 0.5 ml, steril insülin iğneleri yardımıyla 4 0.5 ml olmak üzere, toplamda 2 ml hasta örneği, Xpert MTB/RIF kartuşuna aktarılarak GeneXpert<sup>®</sup> MTB/RIF RT-PCR

cihazına yerleştirilerek işlem başlatıldı. İşlem sonucunda cihazın elde ettiği verilere göre, MTB varlığı ve RIF direnci olup olmadığı belirlendi.

### **3.2.6. İstatistiksel Analiz**

Çalışmada elde edilen veriler, SPSS 14.0 programına yüklenerek, testlerin arasındaki istatistiksel açıdan farklılığa ‘McNemar testi’ aracılığıyla bakıldı. Anlamlılık seviyesi 0.05 olarak alındı.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamız, 2012-2014 yılları arasında, Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi ile Balıkesir-Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nde yürütülmüştür. Çalışmaya, toplamda 96 primer tüberkülozlu hasta dahil edilmiştir.

Çalışmaya katılan hastaların Tablo 7'de belirtildiği gibi %76'sının (73) erkek, %24'ünün (23) kadın hastalardan oluştuğu görüldü. Ayrıca çalışmaya katılan erkek hastaların yaş ortalaması 51.2 olup, 35 yaş altında olan hasta sayısı 14, 35 yaş ve üstünde olan hasta sayısı ise 59 'dur. Kadın hastaların yaş ortalaması ise 50.7 olup 35 yaş altında olan hasta sayısı 5, 35 yaş ve üstünde olan hasta sayısı ise 18'dir. Tablo 8'de belirtildiği gibi hastalardan alınan örneklerin %92.8'ini (89) balgam, %4.2'sini (4) bronkoalveolar lavaj, %1'ini (1) trakeal aspirat, %1'ini (1) plevra ve %1'ini (1) ise biyopsi örneği oluşturmaktadır.

**Tablo 7.** Çalışmaya Katılan Hastaların Cinsiyetlerine ve Yaş Durumlarına Göre Dağılımları.

Hasta Cinsiyeti	Hasta Sayısı	Yaş (Ortalama)	35 yaş altı hasta sayısı	35 yaş ve üstü hasta sayısı
Kadın	23	50.7	5	18
Erkek	73	51.2	14	59
<b>Toplam</b>	<b>96</b>	-	<b>19</b>	<b>77</b>

**Tablo 8.** Çalışmada Kullanılan Örnek Çeşitlerinin Sayı ve Yüzde Dağılımları.

Hasta Örneği	Sayı	Yüzde (%)
Balgam	89	92.8
Bronko-Alveolar Lavaj (BAL)	4	4.2
Trakeal Aspirat	1	1
Plevra	1	1
Biyopsi	1	1
<b>Toplam</b>	<b>96</b>	<b>100</b>

VersaTREK sıvı kültür yöntemiyle antimikrobiyal duyarlılık testi uygulanan 96 hasta örneğinin sadece 1'inde, RIF direnci saptanırken, GeneXpert® MTB/RIF RT-PCR moleküler yöntemiyle de çalışılan 96 hasta örneğinin hiçbirinde RIF direnci saptanmadı.

İncelemeye alınan 96 örnekte, kültür yöntemleri kullanarak, L-J ve VersaTrek ile sırasıyla %62.5 (60) ve %81.3 (78) oranında pozitiflik saptandı. GeneXpert® MTB/RIF yöntemi ile incelenen 96 örneğin %93.8'i (90) pozitif olarak bulundu. ARB (+) 89 örneğin %97.8'i (87) ve ARB (-) 7 örneğin ise %42.9'u (3) pozitif olarak bulundu. Pozitif olan 90 örneğin %45.6'sı (41) orta düzey pozitif, %27.8'i (25) düşük düzey pozitif, %24.4'ü (22) ise yüksek düzeyde pozitif ve %2.2'si de (2) çok düşük düzey pozitif olarak saptandı. MTB saptanamayan örnek sayısı ise %6.3 (6) olarak bulundu.

#### 4.1. ARB Boyama ve Kültür Verilerinin Kıyaslanması:

##### 4.1.1. ARB (+) Hasta Sonuçları:

Çalışmaya dahil edilmiş olan ARB sonucu pozitif (+) olan 89 hastanın VersaTREK ve RT-PCR verilerini incelediğimizde; Tablo9 verilerinde belirtildiği gibi VersaTREK üremesi olmayıp, RT-PCR ile TB basili tespit edilen hasta örnek sayısı %18 (16), VersaTREK kültür sistemi ve RT-PCR ile TB basili tespit edilen hasta örnek sayısı %79.8 (71) olup, VersaTREK kültür sisteminde üremeyen ve RT-PCR ile TB basili tespit edilemeyen hasta örneği sayısı ise %2.2 (2) olarak bulunmuştur.

**Tablo 9.** ARB (+) Hastaların VersaTREK ve Cepheid RT-PCR Verileri.

ARB (+)	VT <sup>a</sup> (+) RT-PCR <sup>b</sup> (+)	VT <sup>a</sup> (-) RT-PCR <sup>b</sup> (+)	VT <sup>a</sup> (-) RT-PCR <sup>b</sup> (-)	Toplam
H <sup>c</sup>	71	16	2	89
%	79.8	18	2.2	100

<sup>a</sup>: VersaTREK, <sup>b</sup>: Cepheid Realtime-PCR, <sup>c</sup>: Hasta sayısı

Çalışmaya dahil etmiş olduğumuz ARB sonucu pozitif (+) olan 89 hastanın L-J ve RT-PCR verilerini incelediğimizde; Tablo 10 verilerinde belirtildiği gibi L-J üremesi olmayıp RT-PCR yöntemi ile TB basili tespit edilen hasta örnek sayısı %30.3 (27), L-J yöntemi ile üremesi olan, RT-PCR yöntemiyle de TB basili tespit edilen hasta örnek sayısı %67.5 (60), L-J yöntemiyle üremesi olmayan ve RT-PCR ile TB basili tespit edilemeyen hasta örnek sayısı ise %2.2 (2) olarak bulunmuştur.

**Tablo 10.** ARB (+) Hastaların L-J ve Cepheid RT-PCR Verileri.

ARB (+)	L-J <sup>a</sup> (+) RT-PCR <sup>b</sup> (+)	L-J <sup>a</sup> (-) RT-PCR <sup>b</sup> (+)	L-J <sup>a</sup> (-) RT-PCR <sup>b</sup> (-)	Toplam
H <sup>c</sup>	60	27	2	89
%	67.5	30.3	2.2	100

<sup>a</sup>: VersaTREK, <sup>b</sup>: Cepheid Realtime-PCR, <sup>c</sup>: Hasta sayısı

#### 4.1.2. ARB (-) Hasta Sonuçları:

Çalışmaya dahil etmiş olduğumuz 96 hastadan, ARB sonucu negatif (-) olan 7 hastanın L-J, VersaTREK ve RT-PCR verilerini incelediğimizde; Tablo 11 ve Tablo 12'de belirtildiği gibi VersaTREK kültür sisteminde 7 hasta örneğinin tamamında TB basili tespit edilirken, GeneXpert<sup>®</sup> MTB/RIF ile örneklerin sadece %43'ünde (3) TB basili saptandı.

**Tablo 11.** ARB (-) Hastaların VersaTREK ve Cepheid RT-PCR Verileri.

ARB (-)	VT <sup>a</sup> (+) RT-PCR <sup>b</sup> (+)	VT <sup>a</sup> (-) RT-PCR <sup>b</sup> (-)	Toplam
H <sup>c</sup>	3	4	7
%	42,9	57,1	100

<sup>a</sup>: VersaTREK, <sup>b</sup>: Cepheid Realtime-PCR, <sup>c</sup>: Hasta sayısı

**Tablo 12.** ARB (-) Hastaların L-J ve Cepheid RT-PCR Verileri.

ARB (-)	L-J <sup>a</sup> (-)	L-J <sup>a</sup> (-)	Toplam
	RT-PCR <sup>b</sup> (+)	RT-PCR <sup>b</sup> (-)	
H <sup>c</sup>	3	4	7
%	42,9	57,1	100

Çalışılan 96 hasta örneğinin katı kültür, sıvı kültür ve moleküler yöntem verileri ile ARB verileri karşılaştırılarak sonuçları Tablo 13'te belirtildi. L-J besiyeri için; %62.5 (60) örnekte, hem ARB, hem de L-J kültürü pozitif tespit edildi. %30.2 (29) örnekte ARB pozitif, L-J kültürü negatif tespit edildi. %7.3 (7) örnekte hem ARB, hem de L-J kültürü negatif tespit edildi. VT sıvı kültür yöntemi için; %73.9 (71) örnekte hem ARB, hem de VT kültür sonuçları pozitif tespit edildi. %7.3 (7) örnekte ARB negatif, VT kültür sonuçları pozitif tespit edildi. %18.8 (18) örnekte ARB pozitif, VT kültürü negatif tespit edildi. RT-PCR için; %90.6 (87) örnek için hem ARB, hem de TB basili varlığı pozitif olarak tespit edildi. %3.1 (3) örnek için ARB mikroskopisi negatif, ancak TB basili varlığı pozitif olarak tespit edildi. %2,1 (2) örnek için ARB mikroskopisi pozitif, TB basili varlığı negatif tespit edildi. %4,2 (4) örnek için ise hem ARB mikroskopisi, hem de TB basili varlığı negatif olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 13.** Çalışılan 96 Örnekte Kültür ve Moleküler Yöntem Verileri ile ARB Verilerinin Karşılaştırılması.

Elde Edilen Sonuç	Kullanılan Yöntem	ARB mikroskopisi		Toplam
		Pozitif	Negatif	
Pozitif	VersaTREK	71	7	78
	L-J	60	-	60
	RT-PCR	87	3	90
Negatif	VersaTREK	18	-	18
	L-J	29	7	36
	RT-PCR	2	4	6

ARB'si pozitif 89 örneğin, GeneXpert® MTB/RIF, VT kültürü ve L-J kültür yöntemlerinin her birisinin duyarlılıkları sırasıyla; %97.8; %79.8 ve %67.4 olarak hesaplandı. Hesaplanan bulgular doğrultusunda; GeneXpert® MTB/RIF bulguları ile L-J ve VT kültür bulgularının arasında fark, istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ;  $p = 0.002$  ve  $p < 0.05$ ;  $p = 0.001$ ).



## 5.TARTIŞMA

TB; tanı ve tedavi yöntemlerindeki önemli derecede ilerlemeler olmasına rağmen önemini günümüzde de koruyan bir hastalıktır. Mikroskopide görülebilen ancak kültürde oldukça geç üreyen MTB'in tanısı için kullanılan moleküler yöntemler, her ne kadar hızlı sonuç verse de hala MTB tanısı için tek başına yeterli değildir. DSÖ'nün “*Stop TB*” Ortaklığı hedeflerine ulaşabilmesi için DGTS'nin tek başına yeterli olmayacağı düşünülmüş ve DSÖ tarafından bu düşünce açıklanmıştır (Tekerekoğlu ve ark, 2000; Eroğlu, 2003; Özkara, 8 Mart 2013).

TB tedavisinde erken tanı ve ilaç direncinin mümkün olan en kısa sürede tespiti, hastanın tekrar sağlığına kavuşabilmesi ve hastalık bulaştırıcılığının ortadan kaldırılmasında çok önemlidir (Tekerekoğlu ve ark., 2000).

MTB üremesinin görünür hale gelmesi, haftalar alan bir süreç olduğu için kültür ve antimikobakteriyel ilaç duyarlılık testlerinin (AİDT) sonuçlarının alınması da oldukça uzun sürecektir. Tanıda mikroskopi, çabuk sonuç vermesinin yanı sıra, uygulama kolaylığı ve düşük maliyetiyle her ne kadar öne çıksa da kültür ile desteklenerek enfeksiyonun var olup olmadığına karar verilmelidir (Muz ve ark, 2000). Moleküler yöntemler, en ufak bir üremede bile, saatler içerisinde ilaç direncini tespit edebildiği için klasik AİDT'den çok daha üstün durumdadır. Ancak birden çok gen bölgesi ilaç direncinden sorumluyorsa, bu durumda, tüm direnç genleri için ayrı işleme gereksinim duyulması ve dirençten sorumlu olmayan sessiz mutasyonların belirlenmesi, moleküler yöntemler için bir olumsuzluktur (Kocagöz, 2007; Çavuşoğlu, 2003). Klasik AİDT ile dirençli olduğu belirlenen, ancak moleküler yöntemlerde gen üzerindeki mutasyon bölgelerinin tespit edilemediği durumda, genin farklı bölgesindeki bir mutasyonun ya da farklı bir mekanizmanın dirence yol açtığı düşünülebilir.

TB hastalığının tedavisine başlanması ve daha fazla kesime bulaşmasını engellemek için tanının hızlı konulması, çok önemlidir. MTB, üremesi oldukça uzun süren bir bakteri olduğu için mikroskopik tanı, her gün geliştirilmekte olan yeni yöntemlere rağmen tanının hızlı konulabilmesi, yüksek derecede özgüllüğe sahip olması, kolay ve çabuk uygulanabilir, hem de oldukça ekonomik olması sebebiyle hala önemini korumaktadır. Her ne kadar özgüllüğü yüksek olsa da duyarlılığı; örnek kalitesi, yayma kalınlığı, mikroskop ve boyanın kalitesi, incelemeyi yapan personelin deneyimi vb. nedenlere bağlı olarak değişiklik gösterir (Özakın ve Gedikoğlu; 2003, Ceyhan 2007).

Günümüzde, özellikle moleküler yöntemlerdeki bir çok gelişmeye rağmen, kültür yöntemleri hala 'altın standart' olarak önemini korumaktadır. Kültürde MTB üremiş olması demek, aynı zamanda TB tanısının da kesin olarak konulması demektir. Yapmış olduğumuz çalışmada, L-J yumurta bazlı katı besiyeri 'altın standart' olarak kabul edilmiştir.

VersaTrek tam otomatik sıvı kültür sisteminde işleme aldığımız hasta örnekleri, dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi sonrası ekimleri yapılarak inkübasyona bırakıldı ve üremesi olan örnekler, cihazın çalışma prosedürü doğrultusunda, antimikrobiyal duyarlılık testine alındı. Üreme olmayan örnekler, negatif olarak bildirilmeden önce, cihazda 42 gün boyunca inkübe edildi. Ortalama olarak 14-42 gün süren klasik katı kültür yöntemine göre, kısa bir periyod sonrasında antibiyogram sonuçları çıkarılabilmesi bakımından, oldukça avantajlıdır ancak kültür-antibiyogram işlemi sırasında kontaminasyon ve sonuçlarının çıkmasının uzun sürmesi de oldukça önemli bir dezavantajdır.

Sıvı kültür işlemine alınan hasta örnekleri, GeneXpert® MTB/RIF RT-PCR cihazında da işleme alındı. Dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi uygulanmış kültüre alınan hasta örnekleri kullanıldı. Örnekler, PCR işlemi için cihazın çalışma prosedürü doğrultusunda, kitlerin içerisine aktarıldıktan sonra cihaza yüklemeleri yapıldı. İki saat gibi oldukça kısa bir sürenin sonunda, hasta örneklerinin MTB içerip içermediği, RIF direnci olup olmadığı ve MTB'in örnek içerisindeki konsantrasyonu saptandı. Hızlı ve güvenilir olmasının yanı sıra, uygulaması da oldukça kolaydır.

GeneXpert® MTB/RIF yönteminin, yayma pozitif örnekler için duyarlılığı %97.7, özgüllüğü ise %98.5 olarak bildirilmiştir. Yayma negatif örneklerde ise özgüllük yüksek (%98.8) olmasına rağmen duyarlılık düşük (%76.1) düzeyde kalmaktadır (U.S. Food and Drug Administration, 20 Nisan 2014). Bu çalışmada ise yayma pozitif örnekler için duyarlılık %97.8 olarak saptanmış olup, az sayıda olan (7) yayma negatif örneklerde ise duyarlılık %42.9 olarak bulunmuştur. Çalışılan hasta örneklerinin MTBC oldukları kaset testi ile doğrulandıktan sonra çalışmaya alınmaları sebebiyle yanıltıcı olabileceği için yöntemin özgüllüğü ile ilgili değerlendirme yapılmamıştır.

Yapılan başka bir çalışmada, 50 klinik örnekte, GeneXpert® MTB/RIF yöntemi konvansiyonel yöntemlerle ve BACTEC MGIT 960 sıvı kültür yöntemi ve RT-PCR (Qiagen) ile kıyaslanmıştır (Abdulmajed, 2011). Çalışmada kullanılan RT-PCR ile GeneXpert® MTB/RIF moleküler yöntem verileri arasında fark görülmemiştir. Elli klinik TB şüpheli örneğin 24'ünde (% 48) hem kültürde hem de Xpert MTB/RIF ile pozitiflik saptanırken, 13'ünde (% 26) her iki yöntem de negatif sonuç vermiştir. Beş örnekte ise Xpert MTB/RIF pozitif sonuç verirken kültürde negatif sonuç alınması bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Aynı çalışmada, Xpert MTB/RIF yönteminin duyarlılığı yine bizim değerlerimize (% 97.7) çok yakın bir şekilde %97.7 olarak tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda ise 74 örnekte (% 77.1) VT sıvı kültürde ve Xpert MTB/RIF ile pozitiflik saptanırken 16 örnekte (% 16.7) VT negatif, Xpert MTB/RIF pozitif sonuç vermiştir. 4 örnekte VT pozitif, Xpert MTB/RIF negatif sonuç tespit edilmiştir. Ayrıca 60 örnekte L-J ve Xpert MTB/RIF ile pozitiflik saptanırken 30 örnekte L-J negatif, Xpert MTB/RIF pozitif sonuç vermiştir. L-J pozitif Xpert MTB/RIF negatif sonuç veren örnek olmamıştır.

Çalışmamızda, bir örnekte VT ile rifampisin direnci saptanırken, Xpert MTB/RIF ile direnç saptanmamıştır. Aynı şekilde, söz konusu çalışmada, benzer bir şekilde, BACTEC MGIT ile bir örnekte rifampisin direnci saptanırken, Xpert MTB/RIF ile direnç saptanmamıştır.

Maliyetinin yüksek olması, önemli bir çekince oluşturmaktadır. MTBC dışı mikobakteriler saptanamamaktadır. Ölü veya canlı tüberküloz basili DNA'sını saptadığı için tedavi takibinde kullanılması uygun görünmemektedir. Yalancı pozitiflik ya da negatiflik görülebileceği her zaman göz önünde bulundurulmalıdır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamıza katılan tüm hastalar, primer TB klinik tanısı konulan hastalar olup, DSÖ verilerine paralel olarak, erkek bireylerde ve 35 yaş üzeri hastalarda, TB daha fazla görülmüştür.
2. Çalışmada kullanılan GeneXpert® MTB/RIF RT-PCR yöntemi ile MTBC ailesi dışındaki mikobakteriler tespit edilmemektedir.
3. Çalışılan 1 hasta örneğinde VersaTREK sıvı kültür sistemi ile RIF direnci tespit edilirken, aynı hastada MTB/RIF yöntemiyle RIF direnci gösterilememiştir. Bu örnekte, RIF direncine yol açan bakteriyel RNA polimeraz mutasyonunun veya direncin mekanizmasının MTB/RIF sistemiyle tespit edilemediği anlaşılmaktadır.
4. ARB ve L-J kültürü (+) örneklerde ve ARB (+), L-J kültürü (-) örneklerde; VersaTREK sıvı kültür sisteminde üremesi olmayıp MTB/RIF ve RT-PCR ile TB basili önemli sayıda hasta örneğinde tespit edilirken, VersaTREK sıvı kültür sisteminde üreyip MTB/RIF ve RT-PCR ile TB basili tespit edilemeyen hasta örneği bulunmamaktadır. Bu da kullanılan moleküler yöntemin, konvansiyonel yöntemler için önemli bir doğrulayıcı-tamamlayıcı unsur olabileceğini göstermektedir.
5. ARB (+) olan hastaların primer TB hastası olduğu dikkate alındığında; VersaTREK ve L-J kültür yöntemleriyle TB basili üretilemeyen örneklerde, MTB/RIF yöntemiyle TB basilinin varlığının gösterilmiş olması ve bu vakalarda laboratuvar tanısının klinik tanı ile doğrulanmış olması, erken tanı ve hastanın izolasyonu ve tedavinin başlatılması bakımından büyük önem taşımaktadır.
6. ARB ve L-J kültürü (-) ve VersaTREK kültürü (+) 7 örneğin 4'ünde, dondurulup çözülen örneklerle çalışılan MTB/RIF yöntemiyle TB basili tespit edilememiştir. Bu sonucun, sıvı kültür işlemi için yeni gelen örneğin, moleküler yöntemde ise dondurulup çözülen örneklerin kullanılması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

7. ARB, kültür ve moleküler yöntem sonuçları karşılaştırıldığında, ARB verileriyle moleküler yöntem verileri arasında bir uyum olduğu söylenebilir.

8. Kültür yöntemlerinin uzun süreli inkübasyon süreleri (VersaTREK için yaklaşık 14 gün, L-J kültürü için yaklaşık 40 gün) dikkate alındığında, yaklaşık 2 saat süren MTB/RIF yöntemi, erken tanı ve hastanın izolasyonu ve tedavinin başlatılması bakımından büyük önem taşımaktadır.

9. MTBC bakterileri için kısa sürede sonuç veren MTB/RIF yönteminin, primer TB olgularının ve bu olgularda RIF direncinin tespitinde bir tarama testi olarak çok önemli işlev göreceği öngörülmektedir.

10. Bu yöntem, bakteri canlılığını belirlemediği için TB hastalarının tedavisinin takibinde yararlı olmayabilir.

11. Kültür yöntemlerinde, örnekte MTBC bakteri sayısının fazla olmaması, dekontaminasyon-homojenizasyon işlemlerinin bakterinin canlılığına zarar vermesi ve kontaminasyon gibi nedenlerle, MTBC varlığının gösterilememesi sebebiyle de, MTB/RIF yönteminin konvansiyonel yöntemleri tamamlayıcı bir nitelik taşıdığı ve her iki yaklaşımın tek başına tanıya yeterli olamayacağı şeklinde değerlendirilmektedir.

## KAYNAKLAR

Abdulmajed O. Klinik Örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması. Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2011.

Abebe F, Holm-Hansen C, Wiker HG, Bjune G. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scan J Immunol*, 2007, 66:176-191.

Acid-Fast Stain Protocols. ASM MicrobeLibrary.

<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2870-acid-fast-stain-protocols>. 25 Şubat 2013.

Adams F. On Phthisis.

<http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.01.0254%3Atext%3DSD%3Abook%3D1%3Achapter%3D8>. 5 Şubat 2013.

Ajobiwe JO, Tiri A. Critical appraisal of fluorescent and ordinary light microscopes in *Mycobacterium tuberculosis* diagnosis at national hospital Abuja, Nigeria. *Internet J Microbiol*, 2013; 12(1):8.

Aksu M, Toprak S. The importance of associations in the struggle against tuberculosis in Turkey. *Tuberk Toraks*, 2012, 60(3):291-294.

Albay A. İçinde: *Klinik Mikrobiyoloji*, Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M, (Çeviri Sditörleri). *Manual of Clinical Microbiology*, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 9. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., 2009: 543-72.

Albert Calmette (1863-1933). Pasteur Enstitüsü.

[http://www.pasteur.fr/infosci/archives/e\\_cal0.html](http://www.pasteur.fr/infosci/archives/e_cal0.html). 3 Mart 2013.

Alp A. Tüberküloz basili ve özellikleri. İçinde: Bilgiç H, Karadağ M (editör). *Tüberküloz*, 11. sayı. Bursa, AVES Yayıncılık, 2010: s.48-51.

Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, Blazquez J et al. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov: A taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, 49:1263-1273.

Arslan Güzel A. Tüberkülozla İlişkili Tartı Kaybında Leptin, İnsülin, c-Reaktif Protein ve Lipid Profilinin Yeri, Uzmanlık Tezi, İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, 2005.

Avkan Oğuz V. Auramine-Rhodamine Floresan Boyama. İçinde: V. *Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı*, Diyarbakır, 2006: 34-38.

Avkan Oğuz V. Mikrobiyolojik ve moleküler tanı yaklaşımı ve dirençte son durum. EKMUD 2013 Bilimsel Platformu, Antalya, 2013:108-112.

Bajaj D, Batra JK. Heat Shock Proteins in *Mycobacterium tuberculosis*: Involvement in Survival and Virulence of the Pathogen. In: Cordona PJ (ed). *Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli*. 2012:257-276.

Barış İY. Dünya'da tüberkülozun tarihi. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2010, 3(2):1-4.

Barış İY. Osmanlı'da tüberküloz. *Toraks Dergisi*, 2002, 3(3):335-337.

Başkesen T, Sürücüoğlu S, Öztürk N, Ecemiş T. Tüberküloz tanısında Löwenstein-Jensen besiyeri ile BACTEC 460TB kültür sistemlerinin karşılaştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2010, 30(5):1469-1475.

Baylan O. İlaça dirençli tüberkülozun tedavisi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2012; 32(3):788-804.

Bekierkunst A. Acute granulomatous response produced in mice by trehalose-6,6-dimycolate. *J Bacteriol*, 1968, 96(4):958-961.

Bilgiç H. Akciğer Tüberkülozu Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. Toraks Derneği 2.Kış Okulu, Konya, 2003.

Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, Fujiwara P et al. 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.

Bradner L, Robbe-Austerman S, Beitz DC, Stabel JR. Chemical decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide improves recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* organisms from cultured milk. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(7):2139-2146.

Braun CA, Anderson CM. *Pathophysiology:Functional Alterations in Human Health*. USA, Lippincott Williams & Wilkins, 2007:310-340.

Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2003, 83:91-97.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 3684–3689.

Buzgan T. Ülkemizde Aşılama Politikaları. *İçinde: Badur S, Bakır M (Editörler). Aşı Kitabı*. İstanbul, Akademi Uluslararası Yayıncılık San. ve Tic. Ltd. Şti., 2012:55-57.



Cavanagh R, Begon M, Bennett M, Ergon T, Graham IM, de Haas PEW, Hart CA et al. *Mycobacterium microti* infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(9):3281-3285.

Ceyhan İ., Tüberküloz laboratuvar tanısı. *Klinik Gelişim*, 2007, 20(1): 5-8.

Ceyhan İ. Tüberkülozda Örnek Alma, Mikroskopi ve Mikroskopinin Kalite Kontrolü. *İçinde: Bilgiç H, Karadağ M (editör). Tüberküloz*, 11.sayı. Bursa, AVES Yayıncılık, 2010: s.79-91.

Chan J, Fan X, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipo arabinomannan a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun*, 1991, 59(5):1755-1761.

Cheepsattayakorn A, Cheepsattayakorn R. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction and other advanced molecular diagnostic technologies in comparison to conventional bacteriological methods. *Thai J Tuberculosis Chest Dis Crit Care*, 2006:191-216.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Systematic and Evolutionary Microbiol*, 2003, 53:1305-1314.

Crellin PK, Luo CY, Morita YS. Metabolism of Plasma Membrane Lipids in *Mycobacterium* and *Corynebacteria*. In: Baez RV (ed). *Lipid Metabolism*, Croatia, InTech, 2013:119-148.

Cvetnic Z, Katalinic-Jankovic V, Sostaric B, Spicic S, Obrovac M, Marjanovic S, Benic M et al. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2007, 11(6):652-658.

Çalışır H. Tüberküloz (Verem). <http://torakscerrahisi.com/tuberkuloz-verem/>. 5 Şubat 2013.

Çavuşoğlu C. *Mycobacterium tuberculosis*'de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21.yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003.

Daniel TM. The History of Tuberculosis. *Respir Med*, 2006; 100: 1862-70.

Das S, Das SC, Verma R. Occurrence of RD9 region and 500 bp fragment among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Microbiol Immunol*, 2007, 51(2):231-234.

de Jong E, Rentenaar RJ, van Pelt R, de Lange W, Schreurs W, van Soolingen D, Sturm PDJ. Two cases of *Mycobacterium microti*-induced culture-negative tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(9):3038-3040.

de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum*-review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(9): e744

de Waard JH, Robledo J. Conventional Diagnostic Methods. *In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (Eds.). Tuberculosis*, 2007, 1st ed., 2007:401-424.

Della-Lata P. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. *In: Isenberg HD, Garcia LS. (Eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed., California, ASM Press, 2007: 980-83.

Demirhan Erdemir A, Öncel Ö. A famous turkish physician from military medical school: Dr. Refik Saydam and his public health works. *JISHIM*, 2006, 9(5): 47-53.

Denton KA. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Lung Tissue Using a Fiber Optic Biosensor. Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Güney Florida Üniversitesi, A.B.D., 2006.

Deveci SE, Turgut T, Açık Y, Deveci F, Muz HM. Birinci basamak hekimlerinin akciğer tüberkülozu konusunda bilgi, tutum ve davranışları ile tedavi yaklaşımları. *Tuberk Toraks*, 2003, 51(1):40-47.

Dormandy T. The White Death – A history of Tuberculosis. *J of Antimicrob Chem*, 1999, 44:421-423.

Dubey VS, Sirakova TD, Kolattukudy PE. Disruption of *msl3* abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation. *Mol Microbiol*, 2002, 45(5):1451-1459.

Engelkirk PG, Duben-Engelkirk J. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*, Baltimore, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2008:240-271.

Eroğlu C. Tüberküloz tanısında PCR. 21.yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003.

Ersöz G. Örneklerin İşlemlenmesi ve Kültür Yöntemleri. *İçinde: V.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı*, Diyarbakır, 2006: 22-26.

Erturan Z. Tüberkülozda Diğer Hızlı Tanı Testleri. *İçinde: Bilgiç H, Karadağ M (Editör). Tüberküloz*, 11.sayı. Bursa, AVES Yayıncılık, 2010: 134-148.

Fabre M, Hauck Y, Soler C, Koeck JL, van Ingen J, van Soolingen D, Vergnaud G et al. Molecular characteristics of "*Mycobacterium canettii*" the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. *Infect Genet Evol*, 2010:1165-1173.

Fine PEM, Carneiro IAM, Milstien JB, Clements CJ. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. *World Health Organization*, 1999:1-45.

Frieden T, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet*, 2003, 362(9387):887-899.

Frothingam R, Strickland PL, Bretzel G, Ramaswamy S, Musser JM, Williams DL. Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from West Africa. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6):1921-1926.

Ghosh J, Larsson P, Singh B, Pettersson BMF, Islam NM, Sarkar SN, Dasgupta S et al. Sporulation in mycobacteria. *PNAS*, 2009, 106(26):10781-10786.

Gil F, Grzegorzewicz AE, Catalao MJ, Vital J, McNeil MR, Pimentel M. Mycobacteriophage Ms6 LysB specifically targets the outer membrane of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, 2010, 156:1497-1504.

Goren MB. Mycobacterial Lipids: Selected Topics. *In: Murray RGE (Ed). Bacteriological Reviews*. USA, American Society for Microbiology, 1972, 36(1):33-64.

Guérardel Y, Maes E, Briken V, Chirat F, Leroy Y, Loch C, Strecker G et al. Lipomannan and lipo arabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii*. *J Biol Chem*, 2003, 278(38):36637-36651.

Gülay Z. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. *ANKEM Derg*, 2003, 17(3):192-204.

Günlüoğlu Şafak G. Akciğer Tüberkülozunun Aktivite Tayininde, Bronkoalveolar Lavaj Sıvısında 'Adenozin Deaminaz' İzoenzim Düzeylerinin Rolü. T.C. Sağlık Bakanlığı Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık Tezi, İstanbul: 2004.

Harris E, Lopez M, Arevalo J, Bellatin J, Belli A, Moran J, Orrego C. Short courses on DNA detection and amplification for public health in central and south America: the democratization of molecular biology. *Biochem Educ*, 1993, 21(1):16-22.

Hesseling AC, Rabie H, Marais BJ, Manders M, Lips M, Schaaf HS, Gie RP et al. Bacille Calmette-Guerin vaccine-induced disease in HIV-infected and HIV-uninfected children. *Clin Infect Dis*, 2006, 42:548-558.

Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammerer JS, Morlock GP, Crawford JT et al. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis*, 2008, 47:168-175.

Hou JM, D'Lima NG, Rigel NW, Gibbons HS, McCann JR, Braunstein M, Teschke CM. ATPase activity of *Mycobacterium tuberculosis* SecA1 and SecA2 proteins and its importance for SecA2 function in macrophages. *J Bacteriol*, 2008, 190(14):4880-4887.

Hunter RL, Olsen MR, Jagannath C, Actor JK. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann Clin Lab Sci*, 2006, 36(4):371-386.

İndrigo J, Hunter RL, Actor JK. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology*, 2003, 149:2049-2059.

Kalaycıoğlu O. Akciğer tüberkülozu patogenezi ve kliniği. *T Klin Tıp Bilimleri*, 1994, 14:416-419.

Kalof AN, Evans MF, Cooper K. Special Diagnostic Techniques in Surgical Pathology. In: Gattuso P, Reddy VB, David O, Spitz DJ, Haber MH. (eds). *Differential Diagnosis in Surgical Pathology*, 2nd ed. Philadelphia, Elsevier Inc, 2010:1-38.

Kara S, Büyükvanlı F, Öngel K. Akciğer tüberkülozlu servis şoförü ile temas sonrası bir ilköğretim okulunda yapılan tarama sonuçları. *Euras J Fam Med*, 2012, 1(2): 69-73.

Karlson AG, Lessel EF. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1970, 20(3):273-282.

Kato M. Action of a toxic glycolipid of *Corynebacterium diphtheriae* on mitochondrial structure and function. *J Bacteriol*, 1970, 101(3):709-716.

Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. *CDC*, Atlanta, 1985: 31-70.

Kerr JH, Barrett TL. Atypical Mycobacterial Diseases. In: James WD. (Ed). *Military Dermatology*. Washington DC, Borden Institute Walter Reed Army Medical Central, 1994:391-422.

Khare NK, Duarte FJ, Reynolds RC, Maddry JA. Design, synthesis and activity of thio linked arabinofuranosyl disaccharides against mycobacterial tuberculosis (MTB) and *Mycobacterium avium* complex (MAC). *ARKIVOC*, 2013, ii:290-315.

Kıter G. Tüberküloz tedavisi ve hepatotoksisite. *Tuberk Toraks*, 2000, 48(3):259-265.

Knutson KL, Hmama Z, Herrera-Velit P, Rochford R, Reiner NE. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*, 1998, 273(1): 645-652.

Kocagöz T. Etkin tüberküloz tanısı için nerede, ne zaman, hangi inceleme? *ANKEM Derg*, 2007, 21(ek2):261-265.

Kocagöz T, Saribas Z, Alp A. Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(12):6015-6019.

Kocagöz S, Kocagöz T. Mikobakterilerde *beta-laktamazlar*. *ANKEM Derg*, 1997, 11(2): 227-230.

Kolören Z, Avşar C, Şekeroğlu ZA. Protozoonların tanısında ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi (LAMP). *Türkiye Parazitol. Derg*, 2010, 34:207-211.

Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21.yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003:34-47.

Kubica T, Rüşch-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(7):3070-3077.

Lackie JM. *The Dictionary of Cell and Molecular Biology*, 4th ed. Cornwall, MPG Ltd., 2007:278 ve 332.

Ligon LS, Hayden JD, Braunstein M. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* protein export. *Tuberculosis*, 2012, 92(2):121-132.

Lofthouse EK, Wheeler PR, Beste DJV, Khatri BL, Wu H, Mendum TA, Kierzek AM et al. System-based approaches to probing metabolic variation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS One*, 2013, 8(9):e75913.

Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu C, Ferrante J, Stewart C et al. IL-12-deficient mice are defective in IFN $\gamma$  production and Type 1 cytokine responses. *Immunity*, 1996, 4:471-481.

Meyer CG, Scarisbrick G, Niemann S, Browne ENL, Chinbuah MA, Gyapong J, Osei I et al. Pulmonary tuberculosis: Virulence of *Mycobacterium africanum* and relevance in HIV co-infection. *Tuberculosis (Edinb)*, 2008, 88:482-489.

Middlebrook G, Dubos RJ, Perce C. Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J. Exp. Med.*, 1947; 86: 175-187.

Mikobakterilerin Ekolojisi ve Veteriner Hekimlikte Mikobakteriyoloji.  
İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü.  
<http://www.bornovavet.gov.tr/mikobakteriekoloji.htm>. 10 Nisan 2013.

Muz MH, Turgut T, Muz A. Akciğer tüberkülozunda balgam numunelerinden *Mycobacterium tuberculosis*'in direkt mikroskopi, kültür ve PCR ile saptanması. *Tuberk Toraks*, 2000; 48(1): 5-11.

Narvaiz de Kantor I, Jae Kim S, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval PY et al. Laboratory Services in Tuberculosis Control: Organization and Management, Part I. İtalya, Jotto Associati s.a.s., 1998: 7-9.

Nicod LP. Immunology of tuberculosis. *Swiss Med Weekly*, 2007, 137:357-362.

Niemann S, Richter E, Rüşch-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (Approved Lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int J Systemic and Evolutionary Microbiol*, 2002, 52:433-436.

Nyugen KT, Piastro K, Derbyshire KM. LpqM, a mycobacterial lipoprotein-metalloproteinase, is required for conjugal DNA transfer in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 2009, 191(8):2721-2727.

Onur H. Tüberküloz Enfeksiyonu Araştırılan Çocuklarda Tüberkülin Cilt Testi ve Quantiferon-TB Gold in Tube Testinin Karşılaştırılması. T.C. Sağlık Bakanlığı Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği. Uzmanlık tezi, İstanbul:2009

Otkun M. Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu. *Klimik Dergisi*, 2001, 14(2):71-82.

Özakın C, Gedikoğlu S. Tüberküloz tanısında tüberküloz laboratuvarının rolü: Tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde rutin laboratuvar yöntemlerinin değeri. 21.yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003.

Özbal Y. Tüberküloz immünolojisi. *Erciyes Med J*, 2006, 28(1):25-34.

Özkara Ş. Tüberkülozda Tedavi İlkeleri, Tedavi ve Tedavinin İzlenmesi, Toraks Derneği 1.Kış Okulu, Adana, 24-26 Ocak 2002.  
<http://file.toraks.org.tr/TORAKSFD23NJKL4NJ4H3BG3JH/kisokulu-ppt-pdf/seref.pdf>. 8 Mart 2013.

Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı, Ankara, Rekmay Ltd. Şti, 2003:12, 53 ve 66.

Özkütük N. Klinik Materyalin Hastadan Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi. 21.yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003:278-284.

Özşahin SL. Tüberküloz bakteriyolojisi. *T Klin Tıp Bilimleri*, 1994, 14(6):404-408.

Öztürk R. Tüberkülozda Doğal Direnç ve Risk Faktörleri. 21.yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003.

Pekşen S. Ülkemizde veremle mücadele. *Türkiye'de Verem Savaşı Dergisi*, 2010, 1(1):21-25.

Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schhönbauer M, Glawischnig W. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in West Austria. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(6):2270-2272.

Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*, 2004:213-232.

Rastogi N, Legrand E, Sola C. The Mycobacteria: An introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*, 2001, 20(1): 21-54.

Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Maher M, van Soolingen D, Barry T. Novel multiplex real-Time pcr diagnostic assay for identification and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(2):651-657.

Roach DR, Bean AGD, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol*, 2002, 168:4620-4627.

Rousseau C, Turner OC, Rush E, Bordat E, Sirakova TD, Kolattukudy PE, Ritter S et al. Sulfolipid deficiency does not affect the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice and guinea pigs. *Infect Immun*, 2003, 71(8):4684-4690.

Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology, 4th ed, United States of America, McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2004:187-188.

Sakula A. Robert Koch: Centenary of the Discovery of the Tubercle Bacillus, 1882. In: Matthews H, Brevis A (Eds). *Thorax*, Londra, Eyre & Spottiswoode LTD, 1982: 37:246-251.

Sareen M, Khuller GK. Phospholipids of ethambutol-susceptible and resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biosci*, 1988, 13(3):243-248.

Sarıgüzel S. Direkt Mikroskopi Teknikleri ve Değerlendirilmesi. *İçinde: V.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı*, Diyarbakır, 2006: 27-33.

Seber E. Tüberkülozun dünü. *ANKEM Derg*, 2010: 24 (Ek 2): 52-60.

Sevim T. Tüberküloz patogenezi ve doğal seyir. *Klinik Gelişim*, 2007, 20(1): 5-8.

Sung N, Collins MT. Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1):6833-6840.

Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin klasik yöntemlerle identifikasyonu. *V.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı*, Diyarbakır, 2006:39-51.

Şanlıdağ T, Akçalı S. Sterilizasyon, dezenfeksiyon ve hastane atıkları. *Sağlıkta Birikim*, 1(4): 65-76.

Şengöz G, Yıldırım F, Güldüren S, Şengöz A, Kart Yaşar K, Nazlıcan Ö. Bir nedeni bilinmeyen ateş olgusunda ekstrapulmoner tüberkülozun farklı zamanlardaki farklı formları. *ANKEM Derg*, 2004, 18(2):120-122.

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (1). Doğrudan Gözetimli Tedavi. <http://www.thsk.saglik.gov.tr/tuberkuloz-verem-hastaligi/986-dunyada-ve-turkiye'de-tuberkulozun-durumu-nedir.html>.22 Şubat 2013.

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (2). Dünya'da ve Türkiye'de Tüberkülozun Durumu Nedir? <http://tuberkuloz.thsk.saglik.gov.tr/tuberkuloz/795-dogrudangozetimli-tedavi.html>. 22 Şubat 2013.

Tahaoğlu K, Kongar N, Elbek O, Tümer Ö, Kılıçaslan Z. Tüberküloz gerçeği. *Türk Tabipleri Birliği Tüberküloz Raporu*, 2012, 1:7-12.

Takayama K, Wang C, Besra GS. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(1):81-101.

Tarhan G. Enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemleri. *Güncel Gastroenteroloji*, 2002, 6(3):177-183.

Tekerekoğlu MS, Durmaz R, Özerol İH. *Mycobacterium tuberculosis*'in laboratuvar tanısı. *J Turgut Ozal Med Cent*, 2000, 7(2):171-176.

Toossi Z, Ellner JJ. Host response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci*, 3, 1998:133-140.



Toraks Bülteni.

<http://issuu.com/journalagent/docs/toraksbulteni.18?viewMode=magazine&mode=embed>. 10 Nisan 2013.

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(2):133-146.

Türk Toraks Derneği. Heybeliada Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi.

<http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/book/file/252201116010-heybeliada.pdf>. 6 Şubat 2013.

Türkoğlu S. İnfeksiyon hastalıklarının tanısında moleküler biyoloji tekniklerinin yeri. *ANKEM Derg*, 1998, 12(3):232-237.

U.S. Food and Drug Administration. 510(k) Decision Summary.

[http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/k131706.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/k131706.pdf). 20 Nisan 2014.

Van Soolingen D, Hoogenboezem T, De Haas PEW, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, canetti: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(4):1236-1245.

Van Soolingen D, Van der Zanden AGM, De Haas PEW, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraïne NA, Portaels F et al. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(7):1840-1845.

Vidinel İ. Türkiye'de Tüberküloz Hastalığına Tarihsel Bir Bakış. *İçinde: Bilgiç H, Karadağ M (Editör). Tüberküloz*, 11.sayı. Bursa, AVES Yayıncılık, 2010:17-24.

Walker GT, Frasier MS, Schram JL, Litte MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(7):1691-1696.

WHO, World Health Organization. Weekly Epidemiological Record.

<http://www.who.int/wer/2010/wer8505.pdf?ua=1>. 3 Mart 2013.

WHO, World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2013.

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf?ua=1). 10 Aralık 2013.

Wouk H. *Tuberculosis*. New York, Marshall Cavendish Benchmark, 2010: 28-45.

Yajko DM, Nassos PS, Sanders CA, Gonzalez PC, Reingold AL, Horsburgh CR, Hopewell PC et al. Comparison of four decontamination methods for recovery of *Mycobacterium avium* complex from stools. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(2):302-306.

Yamagami H, Matsumoto T, Fujiwara N, Arakawa T, Kaneda K, Yano I, Kobayashi K. Trehalose 6-6'-dimycolate (Cord Factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body-and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect Immun*, 2001, 69(2):810-815.

Yenibertiz D. Sağlık Çalışanlarında Latent Tüberküloz Enfeksiyonunun saptanmasında Tüberkülin Cilt Testi ve Quantiferon TB-Gold Testinin kullanılması, Uzmanlık tezi, İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2009.

Yetilmezer E. Sığır Sütünde Brucella ve Listeria Tanısı İçin PCR Optimizasyonu. Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2010.

Yüce A. Tüberküloz Kültürü ve Basil Tür Tayini. *İçinde: Bilgiç H, Karadağ M (editör). Tüberküloz*, 11.sayı. Bursa, AVES Yayıncılık, 2010: s.92-109.

Zeytinli Oral Ü. Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spoligotyping ve MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat) Yöntemiyle Tiplendirilmesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2010.

Zhang M, Gong J, Lin Y, Barnes PF. Growth of virulence and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. *Infect Immun*, 1998, 66(2):794.

<b>KİŞİSEL BİLGİLER</b>	
Adı Soyadı	: Onur ÇAĞLAYAN
Doğum tarihi	: 15.06.1988
Doğum yeri	: Altındağ
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çağış Kampüsü 10145 Balıkesir
Tel	: 0535 825 50 30
Faks	: 0266 612 10 09
E-mail	: lethalking@hotmail.com
<b>EĞİTİM</b>	
Lise	: Nevvar-Salih İşgören Lisesi (2005)
Lisans	: Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi (2010)
<b>YABANCI DİL BİLGİSİ</b>	
İngilizce	: Orta derecede (ÜDS 63.75, Mart-2010)