90367

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RUTİN LABORATUAR VE GAZ KROMATOGRAFİSİ YÖNTEMLERİYLE TANIMLANAN *MYCOBACTERIUM* TÜRLERİNİN ANTİ-TÜBERKÜLO İLAÇLARA VE OFLOKSASİNE İN-VİTRO DUYARLILIĞI

Arş. Gör. Dr. Selim GÖRGÜN

90367

Tez Yöneticisi

Doç. Dr. Osman AKTAŞ

Uzmanlık Tezi
ERZURUM 2000

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR IV

KISALTMALAR V

ÖZET VI

SUMMARY VII

1. GİRİŞ ve AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

Epidemiyoloji 4

Mikobakterilerin genel özellikleri 5

Mikobakterilerin üretilmelerinde kullanılan besiyerleri 9

Mikobakterilerin sınıflandırılması 10

İnsanda hastalık yapan mikobakteriler 14

TB basillerinin yaptığı hastalıklar 15

Patogenez ve immunoloji 16

Tedavi ve korunma 18

Antijenik özellikler 19

Mycobacterium tuberculosis'in laboratuar tanısı ve inceleme örnekleri 19

Örneklerin kabulü ve mikrobiyolojik incelemeler 21

A. Mikroskopik incelemeler 21

Yaymaların değerlendirilmesi 24

Sonuçların rapor edilmesi 24

Raporda belirtilmesi gerekenler 25

B. Kültür yöntemleri 25

C. Hayvan deneyleri 27

D. *Mycobacterium tuberculosis*'in ilaç direnci ve in-vitro antimikrobiyal duyarlılığının araştırılması 27

Duyarlılık araştırılmasında kullanılan ilaçlar..... 28
Mikobakterilerin ilaç duyarlılığının araştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntemler..... 29
I. Direk yöntemler..... 29
II. İndirek yöntemler..... 29
1. Geleneksel yöntemler..... 29
Direnç-oran (Resistance Ratio) yöntemi..... 29
Proportion yöntemi..... 29
Diğer geleneksel yöntemler..... 30
2. Radyometrik yöntemler (BACTEC) 30
a. Modifiye proportion yöntemi..... 30
b. PZA duyarlılık yöntemi..... 30
c. MIC tespiti..... 30
E. Yeni tanı yöntemleri..... 30
1. Radyometrik kültür yöntemleri..... 30
2. Nükleik asit probları..... 31
3. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri..... 31
4. Floresan yöntem..... 31
5. Çeşitli hücresel enzimlerin saptanması..... 31
6. Kromatografik tanı yöntemleri..... 31
3. GEREÇLER ve YÖNTEM..... 33
A. GEREÇLER..... 33
1. *Mycobacterium* suşları..... 33
2. Kullanılan besiyerleri..... 33
3. Elektrikle çalışan aletler..... 33
4. Cam araçlar..... 33
5. Metal araçlar..... 34
6. McFarland 1no'lu eşeli..... 34
7. Kimyasal maddeler..... 34
8. Mikobakterilerin yağ asitlerinin saf olarak izolasyonunda kullanılan çözeltiler..... 35

9. Mikobakteriyel yağ asitlerinin saptanmasında kullanılan gereçler..... 35
10. Kağıt ve naylon araçlar..... 35
11. Antimikrobikler..... 36
B. YÖNTEM..... 36
1. *Mycobacterium* suşlarının izolasyonu ve tanısı..... 36
2. Mikobakterilerin gaz kromatografisi yöntemiyle tanımlanması..... 37
a. Saponifikasyon (bakteri hücrelerinin parçalanması) basamağı..... 37
b. Metilasyon basamağı..... 37
c. Ekstraksiyon basamağı..... 37
d. Kromatografik analiz..... 38
3. Antimikrobik duyarlılık işlemi..... 38
a. LJ besiyerlerine antimikrobiklerin eklenmesi..... 38
b. Standart bakteri süspansiyonunun hazırlanması ve LJ besiyerlerine inokülasyon..... 39
c. Sonuçların değerlendirilmesi..... 40
4. BULGULAR..... 41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ..... 45
6. KAYNAKLAR..... 57
EK. Mikobakterilerin ayırt edilmesini sağlayan özellikleri 66

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda yardımlarını gördüğüm, çalışmalarımda beni yönlendiren ve eğitimime büyük katkıları olan tez yöneticim sayın Doç. Dr. Osman AKTAŞ'a, Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Erdal TUNCEL'e, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü'nde "gaz kromotografisi" çalışmalarının yürütülmesinde yardımlarını gördüğüm sayın Yrd. Doç. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e, Anabilim Dalımız öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÖZBEK'e ve duyarlılık deneylerinde kullandığımız bazı maddelerin temininde katkıları bulunan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Ahmet SANİÇ'e teşekkürlerimi borç bilirim.

KISALTMALAR

AARB	Asido-Alkolo Rezistans Bakteri
ARB	Asido Rezistans Bakteri
BCG	Bacille Calmette-Guerin
CDC	Center for Disease Control
CFU	Koloni Oluşturan Ünite
ÇİD TB	Çok İlaca Dirençli Tüberküloz
DOT	Directly Observed Treatment
DOTS	Directly Observed Treatment, Short Course
EM	Etambutol
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	Yüksek Performanslı Likid Kromatografi
INH	İzoniazid
IUALTD	International Union Against Tuberculosis and Lung Disease
LAM	Lipoarabinomannon
LJ	Löwenstein Jensen
MAC	Mycobacterium avium kompleks
MGIT	Mycobacterium Growth Indicator Tube
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MIS	Microbial Identification System
OFX	Ofloksasin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPD	Purified Protein Derivates
RIF	Rıfampin
SDA	Strand Displacement Amplification
SM	Streptomisin
TDM	Tüberküloz dışı mikobakteriler
TB	Tüberküloz
TİD TB	Tek İlaca Dirençli Tüberküloz
WHO	World Health Organization=Dünya Sağlık Örgütü
ZN	Ziehl Neelsen

ÖZET

Çalışma, pulmoner tübeküloz olduğu düşünülen olguların balgam örneklerinden izole edilen ve rutin tanı yöntemlerinin yanısıra Microbial Identification System (MIS) ile gaz-kromatografisi yöntemiyle de tanımlanan çeşitli *Mycobacterium* türlerinin antitüberkülo ilaçlara ve ofloksasine duyarlılıklarının araştırılması amacıyla planlandı.

Gaz-kromatografisi incelemesinde, 52'sinin *M. tuberculosis*, ikisinin *M. xenopi* ve birinin de *M. avium-intracellulare* olduğu saptanan toplam 55 suşun ilaç duyarlılıkları Löwenstein Jensen besiyerinde proportion yöntemiyle araştırıldı. *M.tuberculosis* suşlarınında kritik ilaç konsantrasyonları için streptomisin (SM)'e % 17.3, izoniazid (INH)'e % 3.9, etambutol (EM)'e yine % 3.9 oranında ilaç direnci saptandı. Kritik ilaç konsantrasyonlarında rifampin (RIF) ve ofloksasin (OFX)'e karşı direnç gözlenmedi. Birden fazla ilaca karşı direnç sadece 1 suşta (INH, SM ve EM'e karşı) tesbit edildi. *M. xenopi* suşlarından birisi INH ve RIF direncine sahipken, *M. avium-intracellulare* suşunda ilaç direncine rastlanmadı.

Sonuçta, bölgemizde izole edilen *Mycobacterium* suşlarının denenen antimikrobiklere karşı direnç oranlarının çok yüksek olmaması sevindirici olarak değerlendirilmesine rağmen son yıllarda tüm dünyada tüberkülozlu olgularda ve *Mycobacterium*'ların direnç paternlerinde görülen artışların yöremizi de etkileme olasılığı her zaman vardır. Tüberkülozun daha etkin kontrolü amacıyla, tedavi öncesi bakterinin standart ve hızlı bir şekilde identifikasyonunun yanısıra duyarlılık testlerinin de çalışılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium*, Tüberküloz, Antitüberkülo İlaç Duyarlılığı, Microbial Identification System (MIS), Gaz Kromatografisi

SUMMARY

This study was planned to search susceptibility of *Mycobacterium* species, isolated from the sputum specimens of cases with the suspected diagnosis of pulmonary tuberculosis and identified in the Microbial Identification System (MIS) by gas-chromatography method as well as by routine diagnostic methods, to antituberculous drugs and ofloxacin.

In gas-chromatography study, the drug sensitivity of a total of 55 strains (52 of which were *Mycobacterium tubercolosis*, 2 were *M. xenopi* and one was *M. avium-intracellulare*) were investigated in Löwenstein-Jensen medium with the proportion method. In *M. tubercolosis* strains, the drug resistance for critical drug concentration was detected as 17.3 % to streptomycin (SM), 3.3 % to isoniasid (INH) and also 3.9 % to ethambuthol (EM). The resistance to ofloxacin (OFX) and rifampicin (RIF) was not observed. Only one strain showed multiple drug resistance (against INH+SM+EM). While one of M. xenopi strains has the resistance to INH and RIF, the *M. avium-intracellulare* strain was sensitive to all of the drugs.

In conclusion, although the resistance rates of *Mycobacterium* strains isolated in our region against examined antimicrobics were not much higher, worldwide increases in the frequency of tuberculosis cases and increases in resistance patterns of mycobacteria could also affect our region. For the purpose of more efficient management of tuberculosis, it would be necessary to do the sensitivity tests in addition to standard and rapid identification of bacteria before therapy.

Key words: *Mycobacterium*, Tuberculosis, Antituberculous drug susceptibility, Microbial Identification System (MIS), Gas-chromatography

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mycobacteriaceae familyasının üyesi olan *Mycobacterium* cinsi içerisinde, eski çağlardan beri bilinen halkımızın verem ve cüzzam adını verdiği hastalıkların etkenleri ve klinik önemleri son yıllarda giderek artan tüberküloz dışı mikobakteriler yer almaktadır.

Dr Robert Koch Avrupa'dan Amerika'ya kadar yaygın bir hastalık olan ve her yedi kişiden birinin ölümüne neden olan tüberküloz (TB) hastalığının etkenini 24 Mart 1882 tarihinde keşfetmişti. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization = WHO, DSÖ) ve The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), bakterinin keşfedildiği 24 Mart tarihini dünya TB günü olarak ilan etmiştir [1, 2]. Koch'un keşfi bu ürkütücü hastalığın olası eliminasyonunda bir kilometre taşı olmuştur. Ancak etkili anti-TB ilaçlar 1950'li yıllara varıncaya kadar kullanıma girmediği için TB bu tarihe kadar en korkulan hastalıklardan biri olmaya devam etmiştir [3].

Granülomatöz reaksiyonların görüldüğü bir enfeksiyon hastalığı olan TB, sağaltım yöntemlerindeki ilerlemelerle sanayileşmiş ülkelerde mortalitesi azalmış olmasına rağmen az gelişmiş ülkelerde bu oranın giderek arttığı gözlenmektedir [2-4]. Örneğin ülkemizin de etkilenme olasılığı bulunan düşük gelirli Asya ülkelerinde mortalite hızının 100.000'de 50'yi aştığı iddia edilmektedir [4]. Son yıllarda büyük epidemilerle kendini gösteren ve bağışıklık sistemini etkileyen HIV (Human Immunodeficiency Virus) enfeksiyonlarındaki fırsatçı patojenlerin başında *Mycobacterium* türleri gelmektedir. Dünya genelinde yaklaşık olarak 5 milyon HIV taşıcısının *M. tuberculosis* ile enfekte olduğu bildirilmektedir [5].

Günümüzde TB basilinin ekolojisi, biyokimyası, immunogenetiği hakkında önemli bilgiler elde edilmiş ancak, etkeni olduğu hastalığın kontrolünde çok başarılı sonuçlar alınamamıştır. Bu durumun oluşumunda, dünyanın bir çok bölgesinde etkili tedavi merkezlerinin olmaması, uygulanan uzun tedavi süresince hastanın ilaçları düzenli ve kombine şekilde kullanmaması gelmektedir [6-9]. Düzensiz ve yetersiz yapılan tedavi

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

uygulamaları sonucu, toplumda dirençli basillerin neden olduğu TB olguları da artmaktadır. TB'da ilaç direnci TB basilinin mutasyonları sonucu primer (direnç kazanmış basiller ile enfekte olmuş ve daha önce tedavi görmemiş olgularda görülen) ve sekonder (antitüberkülo tedavi sonucunda duyarlı basillerin ortadan kalkarak dirençli basillerin çoğalmasıyla gelişen) direnç olarak ortaya çıkmakta ve enfeksiyonu oluşturan bakteri popülasyonundaki ilaçlara dirençli mutantlar tedavide sorunlara neden olmaktadır [10].

Antitüberkülo ilaçlara karşı ortaya çıkan direnç sorunu giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Etkili tedavinin elde edilmesi için bakterinin izolasyonundan sonra süratle ve standart bir yöntemle mutlaka ilaç duyarlılığının saptanması gerekmektedir [11].

Bu gerekçelerden yola çıkarak çalışmamızda; rutin tanı yöntemlerinin yanısıra Microbial Identification System (MIS) cihazında gaz-kromatografisi yöntemiyle de tanımlanan çeşitli *Mycobacterium* türlerinin antitüberkülo ilaçlara ve bir florokinolon türevi olan oflaksasine duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Consumption ve phytisis terimleri tüberkülozun tanımına uyan ilk kez Yunan literatüründe kullanılmış tarihsel ifadelerdir. Bugün, eski Yunanistan'da 2000 yıldan daha uzun bir süre önce Hippocrates'in "phthisis" diye tanımladığı hastalığın aslında TB olduğuna inanılmaktadır. Yirminci yüzyılın ilk yarısında verem ya da beyaz veba ismiyle de anılan TB'un, Hippocrates'den günümüze kadar geçen yüzyıllar içerisinde insan ve diğer memelilerin en önemli sağlık sorunlarından birisi olmaya devam ettiği bilinmektedir [12, 13].

TB'un tedavisinde 1800'li yıllara varıncaya kadar yeterli bilgi elde edilememiştir. Eski Mısır mumyalarının kafatası ve spinal kemik kalıntılarında DNA testleri ile doğrulanan TB'a ait bulgular elde edilmiştir [2, 10, 12]. TB'un bulaşıcı olduğu ilk kez 16. yüzyılda Fracastorius tarafından dile getirilse de 19. yüzyılda Willemin tarafından hayvanlarda deneysel TB enfeksiyonlarının oluşturulması ve Robert Koch tarafından bakterinin keşfi önemli tarihsel adımlardır [12, 14].

Tüberkülozun modern dönemi, 1944 yılında *Streptomyces griseus*'tan elde edilen streptomisin (SM)'in kulanıma girmesiyle başlamıştır. Daha sonra 1952 yılında SM'den daha etkili bir ilaç olan izoniazid (INH), 1970 yılında rifampin (RIF) kullanıma girmiş ve tedavide önemli aşamalar elde edilmiştir [2, 10].

Bu ölümcül hastalığın tedavisi ve takibi amacıyla ilk senatoryumun H. Brechmer tarafından 1854 yılında Almanya 'da kurulduğu bilinmektedir. Türkiye'de ise ilk kez 1918 yılında İstanbul'da, 1923 yılında da İzmir'de Verem Savaş derneklerinin kurulması girişiminde bulunulmuş ancak ilk dispanser etkinliği 1929 yılında başlamış, ilk senatoryumun açılışı ise 1932 yılında gerçekleşmiştir. Gerçek anlamda ülkemizin verem savaşına desteği 1949 yılında başlamıştır [2].

Epidemiyoloji

Aslında yoksul ya da gelişmekte olan ülkelerin önemli sorunlarından biri olan TB, gelişmiş ve gelişmekte olan ülke ayrımı yapmaksızın tüm dünyada giderek artmaktadır. Örneğin, en gelişmiş ülkelerin başında gelen Birleşik Devlet'lerde 1985'den 1993'e kadar TB olgu sayısının % 14 oranında arttığı rapor edilmektedir. Son yıllarda gelişmiş ülkelerde görülen bu artışın nedeni olarak; HIV epidemileri, TB'un sık görüldüğü ülkelerden göçler, TB kontrolü ve diğer halk sağlığı sorunları için ayrılan finansmanın yetersizliği gibi faktörlerin önemi üzerinde durulmaktadır [2].

Tüberkülozun diğer enfeksiyon hastalıkları ile kıyaslandığında çok daha fazla ölüme neden olduğu bildirilmektedir. Bu hastalıktan yılda yaklaşık 300.000'i çocuk olmak üzere 3 milyon kişi ölmektedir. Buna göre günde yaklaşık 8000 ölüm ve 24.000 yeni olgu ortaya çıkmakta ve hastalığın ne denli önemli boyutlarda olduğu görülmektedir [15].

DSÖ tarafından, Dünya nüfusunun 1/3'ünün tüberküloz basili ile enfekte olduğu, TB ölümlerinin % 95'inin de az gelişmiş ülkelerde olduğu bildirilmektedir. TB'lu olguların yaş ortalamasına bakıldığında gelişmiş ülkelerde (% 80'i 50 yaş ve üzeri) az gelişmiş ülkelere (% 77'si 50 yaşın altında) göre daha yaşlı bir popülasyon gözlenmektedir. Enfeksiyon risk oranları gözönüne alındığında yine gelişmiş ülkelerde bu oranın çok daha düşük olduğu bildirilmektedir [2]. TB, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde de önemli bir sorundur. Örneğin, Afrika'da 1995-1996 yılları arasında kayıtlı TB olgularında görülen belirgin artışın nedeni olarak HIV enfeksiyonları sorumlu tutulmaktadır [16].

WHO'ya göre tüberküloz açısından ülkeler altı kategoride sınıflanmaktadır. Kategori 0'da olgu rapor etmeyen ülkeler, kategori 1'de DOTS (=Directly Observed Treatment Short-Course) stratejisini uygulamayan ve insidansın 100 binde 10'un üzerinde olduğu ülkeler, kategori 2'de total populasyonun % 10'un altında DOTS stratejisini uygulayan (pilot faz) ülkeler, kategori 3'de total populasyonun % 10-90'nında DOTS stratejisini uygulayan (expansiyon faz) ülkeler, kategori

4'de DOTS stratejisini %90'nın üzerinde uygulayan (rutin faz) ülkeler, kategori 5'de DOTS stratejisini uygulamayan ve insidansın 100 binde 10'nun altında olduğu ülkeler bulunmaktadır.

Türkiye kategori 1'de sınıflandırılan 57 ülkeden birisidir. Tahmini tüberkülozlu olgu sayılarında Rusya Federasyonunun ardından ikinci sırada, resmi rakamlarda 20.212 olgu ile 4. sıradadır [16].

TB'un Türkiye'deki epidemiyolojisine baktığımızda durumun, hiç de iç acıcı olmadığı görülmektedir. Yurdumuzdan WHO'ya bildirilen 1996 yılı verilerine göre TB'lu olgu sayısı 20212'dir. Ancak gerçek sayının çok daha yüksek rakamlarda olduğu ortadadır. Nitekim WHO aynı raporda yurdumuzda tahmin edilen TB olgu sayısının 35000'in üzerinde olduğunu bildirmektedir [16].

Mikobakterilerin genel özellikleri

Mycobacterium ve *Nocardia* cinsleri boyanma özellikleri ve hareketsiz oluşlarıyla; spor oluşturmama ve katalaz üretmeleriyle benzerlik göstermelerinden dolayı *Actinomycetales* ordosu içinde *Mycobacteriaceae* familyasında gruplandırılmıştır. Bu famiya içerisinde; insan ve hayvanların çeşitli organ tüberkülozlarına neden olan tüberküloz basilleri, lepra (cüzzam) etkeni ve yine normalde patojen olmadıkları halde özellikle immun (bağışıklık) sistemi baskılanmış AIDS'li olgularda hastalık yapan ayrıca saprofit olarak doğada yaygın bir şekilde bulunan bakteriler yer almaktadır [2, 10, 11].

Mikobakteriler günümüzde bakteriyolojinin bir alt disiplini olarak mikobakteriyoloji adı verilen ayrı bir bilim dalında incelenmeye başlanmıştır. Mikobakteriyoloji, *Mycobacteriaceae* familyasındaki aside dirençli tüberküloz ve ilişkin hastalık etkenlerinin klinik örneklerden izolasyonu, identifikasyonu ve çeşitli antimikrobiklere direncini inceler. *Mycobacterium*'lar, *Mycobactericea* ailesinde yer alan tek cinstir. Geç ve güç üremeleriyle, aside dirençli olmalarıyla ve hücre duvarlarında fazla miktarda bulunan ve mikolik asit diye adlandırılan uzun zincirli yağ asitlerine sahip olmalarıyla diğer bakterilerden çok farklı özellikler

sergilemektedir. Çoğu toprak ve suda bulunan 60'dan fazla türü bilinmektedir [12, 14].

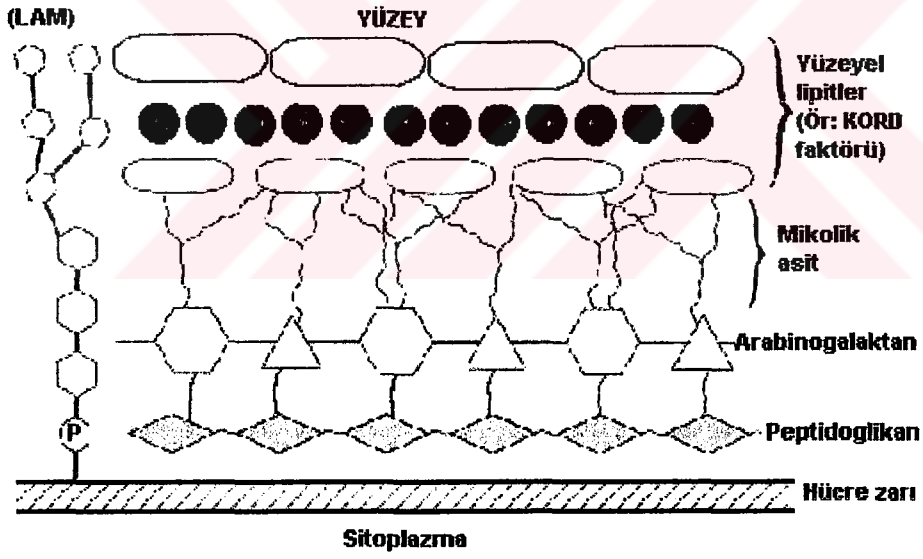
Mikobakteriler klinik örneklerden yapılan boylarda silindirimsi düz ya da kıvrık yaklaşık olarak 1-10 µm uzunluğunda ve 0.2-0.6 um çapında basiller şeklinde görülürler. Eski kültürlerinde ya da uygunsuz koşullarda üremesi durumunda daha uzun, ipliksi veya daha kısa, kokkoid şekillerine rastlanır. Hücre duvarları mikolik asitler, kompleks bal mumları ve glikolipidlerden oluşur. Uzun yan zincirler içeren mikolik asitler fosfodiester bağlarıyla muramik aside ve esterleşmiş glikolipid bağlarıyla da arabinogalaktana bağlanır. Mikobakteriyel hücre duvarı aside dirençlidir (yani karbolfuksinle boyandığında asit etanol ile renksizleştirme işleminde solmaz). Lipidler yönünden zengin olan aynı zamanda kuruluk ve alkali koşullar gibi fiziksel etmenlere de dirençli olan hücre duvarları, aldıkları ilk boyayı asitli organik çözücülerle renksizleştirme işleminde bırakmamaları nedeniyle "aside dirençli bakteriler" (=**ARB**) ya da asit-alkolde renkleri giderilemediği için asıdo-alkolo-rezistans bakteriler (=**AARB**) de denilmektedir. Mikobakterilerin bu önemli özelliği balgam gibi kontamine klinik örneklerde diferansiyel boyama yöntemlerinin uygulanmasına fırsat vermektedir [2, 10, 12, 14, 17, 18].

Diğer önemli hücre duvarı bileşenleri arasında, yapay ortamlarda yılankavi ipler şeklinde üremeyi indükleyen ve "kord faktör" olarak da bilinen trehaloz dimikolat; yine virulansta önemli rol oynayan mikobakteriyel sülfolipidler yer almaktadır. Patogenezde rolü olan bir diğer yapı da lipoarabinomannan (LAM)'dır. Virulan ya da attenüe edilmiş mikobakterilerden saflaştırılmış LAM yapısal olarak değişiklikler gösterebilmektedir. Bu durum mononükleer hücre kültürlerinde sitokin üretimini sitümüle etme yeteneklerindeki farklardan kaynaklanabilmektedir. Bakteri virulansıyla ilgili lipitlerden olan kord faktörü; enfeksiyon bölgesine toplanan makrofajların göçünü engelleyerek granülom oluşmasına neden olur. Patogenezde rolü olan fosfatid yapısındaki LAM; epiteloid ve langhans dev hücrelerinin oluşmasına yol açarak tüberkülin oluşumunu etkilerler [14, 19].

Bu lipitler nedeniyle bakteriler hidrofobik özellik taşırlar sıvı ortamlarda kümeleşme, bir araya toplanma özelliği gösterirler. Onların bu hidrofobik özelliğini kırmak için sıvı ortamlara Tween 80 gibi deterjanlar ilave edilmelidir.

Tween 80 ile yağ-su karışımına ilave edilen mikobkateriler adjuvan etkisi (Freund'ün komplet adjuvanı) kazanmaktadır. Ayrıca pepdidoglikan maddelerden muramil dipepditin de adjuvan özelliğine aracılık ettiği saptanmıştır. Tüberkülozda anaflaktik tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarına yol açan polisakkarid tabakasıdır. Protein tabakası ise gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır [10, 14]. *M. tuberculosis*'in hücre duvarı yapısı Şekil 1.'de görülmektedir.

ŞEKİL 1. *M. tuberculosis*'in hücre duvarının şematik gösterimi



Elektron mikroskopik olarak *M. tuberculosis*'in hücre duvarı yapısında; sitoplazmik zarı çevreleyen ve temel yapısı peptidoglikan olan elektron yoğun tabaka, ortada arabinogalaktan mikolik asit moleküllerinden oluşan ve koruyuculukta rol oynayan elektron transparan tabaka en dışta ise yapısında mikolik asitçe yoğun elektron opak tabaka olmak üzere üç tabaka içerdiği bildirilmektedir [19].

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Kuruluğa dezenfektanlara karşı dirençli olan TB basilleri + 4 °C' de haftalarca, – 70°C' de yıllarca canlılığını koruyabilirler. Ancak 60°C' de 20 dakikada, 70°C' de 5 dakikada ölürler. Pastörizasyon işlemi TB basillerinin bu özelliğine göre geliştirilmiş bir dezenfeksiyon işlemidir. İzbe yerlerdeki tozlarda 10 gün, aktif tüberkülozlu hastaların kitaplarında 3 aydan, toprak ve sularda ise 4 aydan daha uzun bir süre canlı kalabilmektedirler. Kuru balgamda 6-8 ay canlılığını koruyabilirler. Balgamdaki basiller % 5 fenolle 24 saatte, % 0.5 sublime eriyiğinde 6 saatten öce dezenfekte olmadıkları bilinmektedir. Aseton, iyotlu tentür, çamaşır suyu (sodyum hipoklorid), formaldehit gibi kimyasallara karşı dayanıklı değillerdir. Güneş ışığı tüberküloz basillerine kısa sürede öldürücü etki yapar. Malaşit yeşili gibi boyalara diğer bakterilere göre çok daha dayanıklıdır [14].

Mikobakteriler klinik materyallerden, bovine (sığır) serum albumin içeren zenginleştirilmiş agar ortamlarında normal olarak kültürü yapılmasına rağmen üretilmelerinde asparajin, gliserol ve mikronutrient içeren kimyasal yapısı bilinen besiyerleri tercih edilmektedir [20]. En ideal kültür koşullarında bile *M. tuberculosis* ve *M. bovis*'in jenerasyon süreleri 18-24 saat olduğu için çok yavaş ürerler. Bakterinin bu aşırı yavaş çoğalmasının klinik olarak 2 önemi vardır: (1) Hastalık olasılıkla birkaç hafta, hatta aylar önce kazanılmış olmasına rağmen semptomların ortaya çıkışı eşzamanlı olmadığından sinsi ve kronik seyirli olmaktadır. (2) Klinik örneklerde tanımlanabilir mikobakteriyel kolonilerin oluşması 4-6 hafta gibi uzun bir süreyi alacağından özgün tedavinin uygulanmasında gecikme kaçınılmazdır. En çabuk üreyen *Mycobacterium* türleri basit ortamlarda 28-42 ^{0}C'de 3-5 günde ürerler [14, 17, 20].

Mikobakteriler zorunlu aerop'turlar. Bulundukları ortamda % 3-11 oranında CO_2 bulunması üremelerini kolaylaştırır. Optimum üreme ısıları 35-37 ^{0}C olsa da 30-42 ^{0}C sıcaklıklarda üreyebilirler. Optimal pH gereksinimleri 6.3'tür. Enerjilerini gliserin, glikoz ve sitrat gibi karbon kaynaklarının oksidasyonu ile sağlarlar. Öncelikli olarak Embden-Meyerhof yolu ile bazen de pentoz fosfat ve trikarboksilik asit yollarını kullanırlar. Enerji gereksinimlerini sağlarken oluşan hidrojen peroksiti parçalayan

katalaz ve peroksidaz enzimlerine sahiptirler. Mikobakteri türlerinde katalaz enzimlerinin ısıya dayanıklılığı farklılık göstermesi nedeniyle bu özellikleri türlerin birbirinden ayırt edilmesinde bir parametre olarak değerlendirilmektedir (mikobakterilerin bu ayrımı ve diğer farklılıkları bir tablo olarak EK'de verilmiştir). Azot kaynağı olarak da amino asitler, amonyum tuzları gibi azotlu bileşiklerinden faydalanırlar [12, 14].

Mikobakterilerin üretilmelerinde kullanılan besiyerleri [12, 14, 17, 20]

Mikobakterilerin üretilmelerinde 3 tip besiyeri kullanılır:

1. Sentetik besiyerleri: Sauton, Long, Proskauer gibi özellikle BCG aşısı hazırlanmasında kullanılan besiyerleridir. **2. Yarı sentetik besiyerleri**: Dubos, Youmans gibi Tween 80 içeren besiyerleridir. **3. Karışık organik besiyerleri**: Löwenstein-Jensen (LJ), Dorset besiyerleri bu gruba örnek verilebilir. LJ besiyeri. GLİSERİNLİ ve GLİSERİNSİZ olmak üzere iki şekilde hazırlanır. Gliserinli ortamda insan tipi TB basilleri iyi üreme gösterirken, sığır tipi TB basillerinin üremesi kısmen inhibe edilir.

Mikobakterilerin üretiminde kullanılan besiyerleri içeriklerine göre yumurta ya da agar içeren ortamlar olmak üzere iki başlık altında toplanmaktadır:

A. Yumurta içeren ortamlar:

1. LJ : Petragnani besiyerinden daha duyarlı olup rutinde en sık kullanılan besiyeridir
2. Petragnani

B. Agar içeren ortamlar

1. Middlebrook ve Cohen 7H9 - sıvı besiyeri
2. Middlebrook ve Cohen 7H10
3. Middlebrook ve Cohen 7H11: 7H10 ile aynı, ancak % 0.1 kazein hidrolizat ile zenginleştirilmiş olup mikobakterilerin üreme miktarını ve hızını arttırır.

Besiyerlerine çeşitli **inhibitör maddeler** ilave edilerek istenmeyen mikroorganizmaların üremesi engellenir. Örneğin malaşit yeşili ya da kristal viyole kontamine bakterilerin üremesini engeller. Ayrıca besiyerlerine antibakteriyel ya da anti fungal ajanların ilavesiyle selektif ortamlar elde edilebilir. Selektif ortamların kullanılması örneklere dekontaminasyon işlemi uygulanmadan direk olarak ekilme avantajı sağlar [12, 14, 17, 20].

İnkübasyon sonunda bakteriler yığınlar halinde, düzensiz, yüzeyi pürtüklü, kuru, siğil görünümünde, balmumu şeklinde ve kirli beyaz ya da soluk sarı renkli olarak görülürler.

Mikobakterilern sınıflandırılması [12, 14, 17]

A. İnsanda TB oluşturan Mikobakteriler:

1. *M. tuberculosis* (insan TB'u)
2. *M. bovis* (daha çok sığırlarda ve ikincil olarak insanlarda TB)
3. *M. africanum* (Afrika'daki hafif TB olgularından izole edilmiştir)

B. Lepra (=cüzzam) oluşturan mikobakteri:

M. leprae

C. Diğer mikobakteriler: Tüberküloz dışı mikobakteriler = TDM: Pigmentli ya da pigmentsiz, 35-40 yıl öncesine kadar insanlarda patojen olarak tanımlanamayan aside dirençli heterojen bir gruptur. Bu bakteriler tüberküloz basillerinden farklı bir çok özelliğe sahiptirler:

1. Aside direnç derecelerinde farklar vardır.
2. Daha geniş sıcaklık aralıklarında üreyebilirler. En iyi üreyebildikleri sıcaklık derecesi insan vücut ısısı değildir.
3. Büyüme hızları da değişkendir. Bazıları 7 günden daha kısa sürede ürerken bazıları *M. tuberculosis* gibi daha uzun sürede ürerler.
4. Pek çoğu sarı-portakal pigment yapar.

5. Genellikle inokülasyon yoluna bağlı olarak farelerde lezyonlar oluştururlar.
6. RIF, INH, SM,ve EM gibi ilk seçenek anti tüberkülo ilaçlara direnç gösterirler.
7. İnsanlarda genellikle önceden var olan hastalıkla ya da travmalarla ilişkili olarak hastalık yaparlar.
8. Genellikle kolay emülsiye olan düz koloniler oluştururlar [10, 14, 17, 18].

TDM'ler RUNYON tarafından yavaş ve çabuk üreme durumlarına göre iki ana başlık altında sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflandırmada ayrıca bakterilerin pigment oluşturma özellikleri de göz önüne alınmıştır.

Runyon Grup I: Fotokromojenikler: Karanlıkta pigment yapmayan ancak bir süre (yaklaşık olarak 1 saat yeterli) ışığa maruz bırakıldıklarında portakal sarısı pigment oluşturarak üreyen mikobakterilerdir. Bunlar 2-6 haftalık inkübasyondan sonra gözle görülür üreme yaparlar.

***M. kansasii*:** Pulmoner hastalık yapar. *M. tuberculosis*'in aksine bulaşıcılığı yok denecek kadar azdır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nin orta batısısında daha yaygındır. Genito üriner sistem enfeksiyonu, akciğer enfeksiyonu ve lenfadenit oluşturur.

***M. simiae*:** Kolonilerinin pigment oluşturabilmesi için daha fazla (4-8 saat) ışıkta bekletilmesi gerekir. Akciğer, böbrek ve kemik enfeksiyonları yapar.

***M. marinum*:** Özellikle yüzme havuzu kaynaklı olmak üzere; deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, artrit ve osteomyelit nedeni olarak olabilirler.

***M. asiaticum*:** İlerleyici kaviter akciğer hastalığı bulunan hastalardan izole edilmiştir.

Runyon Grup II: Skotokromojenik yavaş üreyenler: Özellikle karanlıkta pigment yaparlar. Bunlar da 2-6 haftalık inkübasyondan sonra

gözle görülür üreme oluştururlar. Üremek için gereksindikleri sıcaklık 25-42 °C arasında değişmektedir.

***M. scrofulaceum*:** Özellikle çocuklarda servikal adenitle ilişkilidir. Biyokimyasal ve antijenik özellikleri dikkate alınarak M. avium ve M. intracellulare ile beraber incelenmektedir.

***M. gordonae*:** Musluk suyunda bulunur ve saprofit olarak değerlendirilir. Non tüberküloz mikobakteriler (TDM) içerisinde en sık izole edilen bakteridir. AİDS enfeksiyonlu hastalarda daha sık olmak üzere; prostetik aort kapağı, akciğer ve eklem enfeksiyonlarında rastlanmaktadır.

***M. szulgai*:** Çok nadir olmasına karşın, genellikle patojenik olup balgamdan izole edilir. Skotokromojen grup içinde kabul edlse de 25oC'de fotokromojen özellik gösterir. Akciğer, deri ve kemik enfeksiyonları yapar.

***M. flavescens*:** Saprofit kabul edilen bir mikobakteridir.

Runyon Grup III: Non-fotokromojenik yavaş üreyenler: Patojen ve non patojen türlerden oluşan heterojen bir grup olup çoğusu pigment yapmaz ve aşırı derecede yavaş ürerler.

***M. avium-intracellulare*:** *M. avium* complex ya da **MAC** diye bilinen bu kompleksde *M. avium* ve *M. intracellulare* yer alır. Biyokimyasal olarak bu bakterilerin ayrımları yapılamamaktadır. Ayrım moleküler tekniklerle yapılabilmektedir. Epidemiolojik amaçların dışında bu türlerin ayrımlarının yapılmasının klinik yönden önemi yoktur. İmmün sistemi baskılanmış örneğin AIDS'li olgulardan en sık izole edilen mikobakterilerdir. AIDS'li hastalardan izole edilen mikobakterilerin % 80'inden fazlası *M. avium-M. intracellulare* bakterileridir. AIDS'li olmayan hastalarda bu oran yaklaşık % 60 olarak bildirilmektedir. MAC tedavisi güçtür. Aşırı derecede ilaç direnci gösterirler. Genito üriner sistem, akciğer enfeksiyonları yanında dissemine enfeksiyonlara da neden olmaktadır [12].

***M. xenopi*:** Su ve su tanklarından, musluklardan, kuşlardan izole edilen ve doğada çok yaygın olarak bulunan bu türün ismi ilk kez *Xenopus laevis* adı verilen Afrika kara kurbağalarından izole edilmesinden dolayı

verilmiştir. Soğukkanlı hayvanlardan izole edilen bu bakterinin üremesi için gereken optimum ısı 42-45°C'dir. Katı besiyerlerinde 37°C'de yavaş ürer. İzolatların yaklaşık % 50'si insanlardaki pulmoner enfeksiyonlarla ilişkilidir. Daha çok direnç kaybı olanlarda, alkol kullananlarda, diyabetik hastalarda tüberküloza benzer akciğer enfeksiyonları ve nadiren genito üriner sistem enfeksiyonlarına yol açar ve mikroskobide çok uzun ve flamanlı çomakçıklar şeklinde görülebilir [12].

***M. terrae*:** Su ve topraktan izole edilirler.Suşların % 10'dan fazlasının insan hastalıklarıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir

***M. ulcerans*:** Daha yavaş olarak ürerler (28-60 gün) ve deride kronik ülserlere neden olurlar.

***M. gastrii*:** Genellikle su ve topraktan izole edilirler.

Runyon Grup IV: Çabuk üreyenler: *M. fortuitum* kompleksi haricinde bu grupta yer alan mikobakteriler saprofittirler ve non patojenler olarak değerlendirilirler. Bu bakteriler 25-42 ^{0}C sınırlarında üreyebilmeleri ve çabuk üremeleri (2-7 gün) ile karakterizedirler. Kolonileri genelde düz olup pigmentli ya da pigmentsiz olabilmektedir.

***M. fortuitum* complex** (*M. fortuitum, M. peregrinum, M. abscessus, M. chelonae*): Bu kompleksin üyeleri özellikle enjeksiyon bölgelerinde ve cerrahi yaralarda sıklıkla etken olarak bulunurlar Özellikle konak direnci düşük kişilerde pulmoner hastalıklarla ilişkin olarak izole edilirler (genellikle *M. abscessus*). MAC'dan sonra TDM içinde enfeksiyon oluşturmada ikinci sırada yer alırlar. Bunlar da MAC gibi rutin kullanılan antitüberkülo ilaçlara direnç gösterirler ve invaziv girişimler ve travmayı takiben yumuşak doku enfeksiyonları yapabilirler.

M. smegmatis: Ürogenital floradan izole edilebilen bir TDM'dir.

İnsanda hastalık yapan mikobakteriler

İnsanda hastalık oluşturan çeşitli *Mycobacterium* türleri Tablo 1.'de verilmiştir.

Tablo 1. İnsanda Hastalık Yapan Mikobakteriler [12, 17, 18].

TÜR	YAPTIĞI HASTALIK
*YAVAŞ ÜREYENLER	
-*M. tuberculosis*	Tüberküloz (insanda)
-M. bovis	Sığır tüberkülozu
-M. leprae	Lepra (cüzzam)
-M. avium	Bu iki tür AIDS'lilerde enfeksiyonlara yol açarlar
-M. intracellulare	Akciğer enfeksiyonları
-M. kansasii	Cilt enfeksiyonları, Artrit, Osteomiyelit
-M. marinum	Çocuklarda servikal adenit
-M. scrofulaceum	Akciğer, kemik, böbrek enfeksiyonları
-M. simiae	Akciğer, cilt ve kemik enfeksiyonları
-M. szulgai	Cilt enfeksiyonları
-M. ulcerans	Akciğer enfeksiyonları
-M. xenopi	
**ÇABUK ÜREYENLER -M. fortuitum -M. chelonae	Genellikle travma ya da invaziv işlemler sonucunda bu organizmaların subkütan dokunun derin kısımlarına girişiyle fırsatçı enfeksiyonlar meydana gelir.

* Yavaş üreyen mikobakteriler; bir sıvı besiyeri'nde 7 günden önce gözle görünür bir üreme göstermezler.

** Çabuk üreyenler ise 7 günden önce gözle görünür üreme gösterirler.

TB basillerinin yaptığı hastalıklar

M. tuberculosis'in tek rezervuarı insandır, ancak primatlar, evcil köpek ve kedi gibi diğer memeliler enfekte olabilmektedir. TB basillerinin insanda yaptığı hastalıklar şu şekilde sınıflandırılmaktadır [10, 12, 17, 18].

1. Akciğer TB'u
2. Plevra TB'u
3. Merkezi sinir sistem TB'u (TB menenjit)
4. Deri TB'u
   a. Primer deri tüberkülozu
      -TB şankrı
      -Miliyer deri tüberkülozu'u
   b. Sekonder deri tüberkülozu
      -Lupus vulgaris
      -Tüberkülozis verrikoza kütis
      -Skrofuloderma
5. Oküler TB (Göz dokularının tutulması, ya da göz lezyonları)
6. Sindirim sistemi TB'u
      -Sindirim kanalı tüberkülozu
      -Karaciğer tüberkülozu
      -Peritonit
7. Genital sistem TB'u
8. Kemik ve eklem TB'u
      -Omurga tüberkülozu (POTT hastalığı)
      -Kalça eklemi tüberkülozu (KOKSALJİ)

Patogenez ve immunoloji

TB basillerinin hastalık yapabilmesi konağa ve bakteriye ait bazı faktörlerle ilişkilidir. Konağa bağlı faktörlerin başında kişinin genetiği, etnik yapısı ve immünitesi, bakteriye ait faktörlerin başında ise treholaz dimikolat, fosfatitler gibi virulans faktörleri gelmektedir. Daha önceden de belirttiğimiz gibi Kronik granülamatöz yangıya neden olan TB'un tipik patolojik bulguları olan tüberkül (granülom) ve langans dev hücreleri bu faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır [2, 10, 12, 17]. Akciğer ve lenf nodü biyopsi örneklerinden yapılan hemotoksilen-eosin preperatlarıyla bu oluşumlar mikroskopide tanımlanabilmektedir.

M. tuberculosis enfeksiyonları balgamlarında virulan organizmaları taşıyan kişilerden saçılan ve az sayıda canlı mikroorganizma içeren damlacıklarla havadan bulaşır. Basiller alveolar boşluklarda alveolar makrofajlar tarafından yutulmuş olarak toplanırlar. Makrofajlar içindeki bakterilerin bir kısmı hücre içi yıkıma uğramadan kalır, çoğalmaya devam eder ve sonunda makrofajı öldürür. Fagositler içinde virulan mikobaklterilerin canlılıklarını sürdürmeleri nedeniyle bu bakterilere **"fakültatif intrasellüler patojenler"** denir. Mikobakterilerin intrasellüler yaşayabilme özelliklerinin mekanizması açık değildir. *M. tuberculosis*'in fagozom-lizozom füzyonunu önlediğine ilişkin bazı kanıtlar vardır. Yine virulan mikobakterilerin fagozomlarda asidifikasyonu önleyebileceği gösterilmiştir. Ayrıca mikobakteriyel hücre duvarını oluşturan -örneğin kord faktörü gibi- maddeler makrofajlara direk olarak sitotoksik etki yapabilmektedir. *M. tuberculosis* tarafından hemolizin ve lipazlar üretilmesine rağmen tüberküloz basillerinin neden fagozoma uğramadıkları konusunda yeterli bilgi yoktur. Tüberkülozda meydana gelen doku yıkımlarının çoğu direk mikrobiyal saldırıdan çok hücresel aşırı duyarlılık sonucu meydana gelmektedir [21, 22].

Duyarlı konak TB basili ile ilk kez karşılaştığında primer TB enfeksiyonu gelişir. Bu ilk enfeksiyon lenf bezleri, bağırsak ve deri gibi organlarda oluşsa da daha çok akciğerlerde görülmektedir. Primer enfeksiyon genellikle akciğerlerin alt ve orta loblarını tutar. Bu sırada

"Gohn" adı verilen granülamatöz odak oluşur ve bu bölgeyi drene eden lenf bezlerinde büyüme gözlenir. Bu oluşumlara birlikte "Gohn kompleksi" ya da "primer kompleks" denilmektedir. Primer enfeksiyon genellikle konağın hücresel immün yanıtına bağlı olarak sınırlandırılabilmektedir [2].

Tüberküloz basilinin proteinlerine karşı organizmada ortaya çıkan bağışık yanıt organizmayı dirençli kılar. Bu olay "**KOCH Fenomeni**" ile açıklanmaktadır. Bu fenomene göre; sağlıklı bir kobaya deri altından canlı virulan tüberküloz basilleri verildiğinde şırınga yerinde şişme, kazeifikasyon, bölgesel lenf bezlerinde şişme meydana gelir. Kobayın hastalığı sırasında başka bir bölgeden tekrar canlı tüberküloz basilleri enjekte edildiğinde bu kez enjeksiyon yerinde daha hızlı bir reaksiyon gelişir ve nekroz oluşur. TB basilleri kobayın vücudunda yayılmadığı ve bölgesel lenf bezleri şişmediği gibi açılan yara da daha çabuk iyileşir. İkinci işlem ölü basillerle yada tüberkülin kullanılarak tekrarlandığında da aynı sonuçlar gözlenir. Ancak, verilen ölü TB basilleri ya da tüberkülin miktarının fazla olması halinde ilk enjeksiyon sonrası gelişen lezyonlar alevlenir ve kobay ölür. Bu olayda; ilk enjeksiyonla verilen tüberküloz basilleri, **duyarlı T** lenfositlerinin oluşmasına yol açar. İkinci kez verilen tüberküloz basilleri ise bu duyarlı T lenfositlerini uyarır. Bu uyarım sonucunda **lenfokinler** salgılanır. Lenfokinler olay yerine **lökosit** ve **makrofajların** gelmesini aktive eder. Makrofaj göçünü engelleyen faktör (MIF) makrofajların olay yerinde kalmasını sağlar ve burada toplanan makrofajlar da bünyelerine aldıkları bakterileri sindirerek parçalarlar. Tüberkülin ya da ölü basillerle yapılan enjeksiyonla duyarlı T lenfositleri uyarılmasına rağmen makrofajlar aktive olmaz ve buna bağlı olarak da bakteriler ortadan kalkmaz Ölü basil ya da tüberkülin miktarlarının fazla olması durumunda ise ilk enjeksiyonda oluşan lezyonlarda doku hasarı gelişir [14].

Yukarıdaki bilgilerden anlaşılacağı gibi, TB enfeksiyonu sonrası konakta hücresel immünite ve geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu gelişmektedir. Aşırı duyarlılığın araştırılmasında da "tüberkülin deri testleri" kullanılır. **Tüberkülin:** Tüberküloz basillerinin yoğunlaştırıldığı kültür

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

süzüntüsüdür. İlk kez hazırlanan tüberküline eski tüberlülin (**Old Tuberculın= OT)** adı verilir. Sentetik besiyerlerindeki kültürlerden hazırlanarak yabancı maddelerden arındırılan saf protein türevlerine **Purified Protein Derivates(PPD)** denir. Tüberkülin Deri Testleri PPD'nin deriye enjekte edilmesiyle yapılır. Kişi daha önce TB basili ile karşılaşmış ise enjeksiyon bölgesinde 48-72 saatte eritem, ödem ve sertleşme meydana gelir. Ciltte oluşan ödem ve sertlik 10 mm ya da daha fazla ise test sonucu pozitif olarak kabül edilir. Bu sonuç TB bakterilerinin vücudu enfekte ettiğini ya da daha önce aşı uygulandığını gösterirken kişinin aktif olarak hasta olduğunu göstermez. Deri testi pozitif olsa da aktif olarak hasta olmayan kişiler enfeksiyonu başkalarına bulaştırmazlar. İnsanda tüberkülin testleri; Montoux, Moro, Pirquet, Volmer deneyleri gibi çeşitli şekillerde deriye uygulanmaktadır [2, 12, 14].

Tedavi ve korunma

Son yıllarda görülen TB salgınları, çok ilaca dirençli TB olgularındaki artış ve hastaların sağaltıma uyumsuzluğu DOTS gibi yeni tedavi stratejilerinin oluşturulmasına neden olmuştur. Günümüzde TB tedavisine en az dört temel antitüberkülo ilaç (INH + RIF + prazinamid (PZA) + EM veya SM) ile başlanması, idame tedavisinde ise INH+RIF veya INH+RIF+PZA kombinasyonlarından birisi ile toplam tedavi süresinin 6-9 aya tamamlanması önerilmektedir [23].

TB'un korunmasında ve tedavisinde başarılı olabilme kriterlerinin başında standart bir ulusal TB kontrol programının uygulanması öngörülmektedir. Bu amaçla, toplumda çıkan yeni olguların deneyimli personelin çalıştığı özel merkezlerde gözlem altında tedaviye alınması, halkın TB konusunda bilgilendirilmesi ve ciddi bir aşılama programının uygulanması gerekmektedir. Fransız mikrobiyologlar tarafından geliştirilen ve M. bovis'ten elde edilen "**bacille Calmette-Guérin (BCG)**" diye adlandırılan attenüe aşı uzun yıllardır 120 den fazla ülkede tüberkülozun önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır [15, 24, 25].

Antijenik özellikler

Tüberküloz basillerinin ilk izolasyonunu gerçekleştiren R. Koch tarafından antijenik özelliği bulunan tüberkülinin keşfinden günümüze kadar bakterinin hücresel bileşenlerinde; protein, lipid ve polisakkarit özellikte pek çok antijenik yapı tanımlanmıştır.

Bunlar arasında; ısı şoku proteinleri (heat schock protein, Hsp) diye isimlendirilen ve molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılan (71 Kda, 65 Kda, 12 Kda gibi) proteinler, koruyucu immunite gelişiminden sorumlu olduğu düşünülen salgısal proteinler, lipoproteinler (38, 27, 26, 19 Kda gibi), ve çeşitli enzimler yer almaktadır [19].

***M. tuberculosis*'in laboratuvar tanısı ve inceleme örnekleri**

Hastalığın tanısı, kişinin TB'lu hastalarla yakın teması; TB geçirmiş ve tedavi almış olması; diyabet, HIV/AIDS gibi immün yetmezlik nedeni bir hastalığı taşıması, uyuşturucu ve alkol bağımlılığı, beslenme bozukluğu gibi risk faktörlerini taşıdığını gösteren anamnestik bulgularla birlikte klinik ve laboratuar bulguları değerlendirilerek yapılmaktadır. Kesin tanı laboratuar bilgilerinden alınmakta ve en önemli sonuçlar mikrobiyolojik çalışmalardan elde edilmektedir.

Mikobakteriyolojik çalışmalarda sterilizasyon ve dezenfeksiyon kurallarına titizlikle uyulmalıdır. Laboratuardaki enfeksiyonlardan korunmak için mikobakteriyolojik çalışmalar ayrı bir odada, hava akımının olmadığı biyolojik güvenlik kabinlerinde; eldiven, gömlek ve maskeler kullanarak çalışılmalıdır. Çalışma ortamı fenolik asitlerle dezenfekte edilmeli ve bu işlemler tam eğitilmiş personel tarafından yürütülmelidir.

Mikrobiyoloji laboratuarlarında *M. tuberculosis* izolasyonu ve tanısında (a) direk mikroskopi (b) kültür (c) hayvan deneyleri (d) antitüberkülo ilaç direncinin araştırılması ve (e) yeni tanı yöntemleri gibi işlemlerden yararlanılmaktadır.

Sıralanan bu işlemlerden güvenilir sonuçların alınabilmesi, gerekli klinik örneklerin seçimi, laboratuara kabulü ve laboratuarda işlenmesi ile direk ilişkilidir.

M. tuberculosis aranması ve izolasyonunda laboratuara gönderilebilecek örnekler aşağıdaki Tablo 2.'de verilmiştir [18, 26].

Tablo 2. *M. tuberculosis* aranması ve izolasyonunda kullanılan örnekler

Klinik Örnek	Açıklama
Respiratuar örnekler • Balgam • İndüklenmiş balgam • Bronkoskopi örnekleri • Laringeal sürüntüler	En sık incelenen örnek balgamdır. Respiratuar mikobakteriyoz tanısı için sabahın erken saatlerinde peşpeşe en azından 3 adet balgam örneğinin alınması gerakmektedir. Örneklerin biriktirilmesi (24 saatlik balgam) kontaminasyonu arttırabileceğinden tavsiye edilmez. Tükrük ya da nazal bölgelerden gelen mukus içermeyen, yaklaşık olarak 2-5 ml balgam örneği toplanmalıdır. Balgamın elde edilmesinde zorluklar olduğu zaman diğer örnekler alınır.
Gastrik aspiratlar ve yıkantı suları	Gastrik içeriğin asiditesi mikobakteriler için zararlı olduğundan aspiratlar ve yıkantılar elde edildikten 2-4 saat sonra işleme alınmalı ya da bir tamponla nötralize edilmelidir.
Beyin Omurilik Sıvısı(BOS)	TB menenjitinde incelenen örnektir. BOS santrifüj edildikten sonra elde edilen çökeltiden ya da örneğin bekletilmesiyle oluşan tüpün dip kısmındaki "örümcek ağı" görünümündeki fibrin birikintisinden öze ile alınarak kültür ve mikroskopik incelemeler yapılır.
Steril vücut sıvıları	Perikardiyal, peritoneal, plevral ve snoviyal sıvılardan yapılan 3 haftalık buyyon kültürleriden katı besiyerlerine pasaj yapılarak TB basilleri üretilmeye çalışılır.
İdrar	Birkaç gün üst üste alınan sabah orta akım idrarı santrifüjlendikten sonra elde edilen çökelti; ya da idrar örneği dekontaminasyon-homojenizasyon işleminden sonra santrifüjlenerek elde edilen çökelti mikrobiyolojik olarak incelenebilmektedir.
Kan	Antikoagulan madde içeren tam kan örnekleri hemolize uğratılıp hücrelerde bulunması olası mikobakterilerin açığa çıkması sağlanır. Kan bu haliyle santrifüj edilerek elde edilen çökelti mikrobiyolojik olarak incelenebilir.
Gaita	Dışkı örneği buyyonda süspansiye edildikten sonra balgam için yapılan işlemler uygulanır.
Genital akıntılar	Steril pamuklu silgiçlerle alınan akıntı örnekleri buyyona aktarılır, vorteksle karışması sağlanır. Daha sonra buyyon santrifüj edilerek mikrobiyolojik olarak incelenir
Biyopsi örnekleri	Daha çok histopatolojik incelemeler amacıyla elde edililen bronş biopsisi, plevra biopsisi, iğne aspirasyonu, lenf nodu biopsisi, karaciğer ve kemik iliği biopsi örnekleri alınmaktadır

Örneklerin kabulü ve mikrobiyolojik incelemeler

Mikrobiyolojik olarak incelenmeye alınacak örnekler kabul edilmeden önce kalite yönünden uygunluğu araştırılmalıdır. Bir örneğin kralına uygun olarak alınması, laboratuara erken olarak ulaştırılması laboratuarda uygulanacak çalışmaların titiz olması kadar önemlidir.

Mikobakteriyel incelemeler için hastanın kliniğine göre çeşitli örnekler kabul edilir. En sık olarak respiratuar örnekler incelenmektedir. Ancak doku, vücut sıvıları, idrar ve gastrik aspiratlar ya da mide yıkantı suları da sık incelenen örnekler arasındadır.

Tüm örnekler laboratuara uygun bir sızdırma olmayan kap içerisinde ve mümkünse buzdolabı sıcaklığında gönderilmelidir. Eğer örneğin gönderilmesinde gecikme olacaksa örneklerin buzdolabında tutulması gerekir.

Örneklerin gönderilmesinde gecikmeler ve buz dolabında saklamama durumunda, normal dekontaminasyon işlemleriyle elimine edilemeyen ve mikobakterilerden daha kısa jenerasyon süresine sahip olan diğer organizmalar aşırı derecede üreyecek ve mikobakterilerin izolasyonunda ve görülmelerinde olumsuz sonuçlar ortaya çıkacaktır. Bu durumlarda klinik örnek kimyasal ajanlarla muamele edilerek kontamine mikroorganizmalar öldürülmelidir. Asit ve alkali dekontamine edici ajanların kullanılmasından sonra, örnek mümkün olan en kısa zamanda nötralize edilmelidir. Dekontaminasyon amacıyla en sık kullanılan % 2'lik NaOH, aynı zamanda örneğin homojen bir şekil almasını sağlar. Bu maddenin nötralize edilmesinde HCl kullanılır.

İlgili klinikten gönderilen laboratuar İstek formu ve örnek kabının üzerindeki etiket eksiksiz doldurulmalı ve hastanın kimliği ve doğum tarihi belirtilmelidir.

A. Mikroskopik incelemeler

Belirgin tüberküloz semptomları olan kişilerden alınan klinik örneklerden direk mikroskopi ile bakterilerin aranması ve ayrıca izolasyonu amacıyla

kültür yapılması tanı için zorunludur. Mikobakterilerin aranmasında özgün olarak kullanılan 2 boyama yöntemi vardır:

1. Floresan (Auramine-Rhodamine) yöntemi:

1. Preperat alevden geçirilerek tespit edilir.
2. Preperata Auramine Rhodamine boyası dökülürek 20 dakika tutulur.
3. Hafif akan çeşme suyundan geçirilerek preperat boya artığı kalmayacak şekilde yıkanır.
4. Preperasyonun üzerine % 5 asit alkol dökülerek 5 dakika renksizleştirme işlemi yapılır.
5. Çeşme suyunda yıkanır.
6. Lam üzerine potasyum permenganat dökülür ve 1 dakika muamele edilir. Bu işlemde süre son derece önemlidir. Potasyum permenganatla 2 dakikadan fazla bekleme durumunda floresanın oluşmayacağı unutulmamalıdır.

Preperat ultraviyole (UV) mikroskopunda karanlık alan kondansatörü kullanarak incelendiğinde aside dirençli bakteriler parlak sarı renkte görülür.

2. Ziehl-Neelsen Yöntemi: Klinik materyalden Zıehl-Neelsen (ZH) yöntemi ile boyama yapılarak ARB aranması rutin kullanılan direk inceleme yöntemlerinin başında gelmektedir. ARB aranması yönünden yapılan boyamaların özgüllüğü % 99, duyarlılığı %25-75 arasındadır. Nitekim, WHO 1999 verilerine göre; 181 ülkeden bildirilen 3.81 milyon TB olgusunda ARB görülme sıklığının % 33'ün üzerinde olduğu rapor edilmiştir [16]. Boyamalardan olumlu, kültürden olumsuz sonuç alınması canlı olmayan mikobakterilerin varlığını gösterir. Bu tür sonuçlar antitüberkülo tedavi alan kişilerden alınabilmektedir. Mikobakterilerin çoğunun yavaş üremeleri nedeniyle mikobakteriyel enfeksiyonların erken tanısında ARB aranmasının önemli bir yeri vardır. Mikroskobik inceleme

aside dirençli basillerin saptanmasında laboratuarda uygulanan en eski, en kolay, en çabuk ve en ucuz tanı yöntemidir. Buna rağmen direk mikroskobide ARB aranması kültürün yerini tutmaz. ARB yaymalarında direk mikroskobik incelemede balgamın her ml.'sinde 10^5 basil bulunması durumunda olumlu sonuç alınabilirken kültürde 10-100 CFU/ml kadar az bakteri bulunması halinde bile olumlu sonuçlar alınabilmektedir. Bu duyarlılıktaki kantitatif farka rağmen balgamın ya da diğer klinik materyallerin boyanıp incelenmesi çeşitli şekillerde yararlı olmaktadır:

1. Mikobakteriyel hastalıkların olası tanısını sağlar.
2. Yaymalar sonucu ARB olumlu hastalar ve enfeksiyonlu olgular daha çabuk tanımlanır.
3. Tüberkülozlu hastalara uygulanan tedavinin başarılı olup olmadığı takip edilebilir.

ZN yöntemi ile boyama işlemi basamaklarını şöyle sıralayabiliriz:

1. Preperat alevden geçirilerek tespit edilir.
2. Preperatın üzeri karbol fuksinle kaplanır ve preperat kaynatılmadan hafif buharlaşacak şekilde 5 dakika boyunca hafif bunzen aleviyle alt kısımdan ısıtılır. Bu süreden ayrı olarak 5 dakika da oda ısısında bekletilebilir.
3. Preperat sudan geçirilerek yıkanır.
4. Renksizleştirme amacıyla % 3'lük asit-alkol dökülerek 3-5 dakika boyunca beklenir. Bu süre içinde preperat üzerinde gözle görünür asit-alkol olmalıdır.
5. Preperat sudan geçirilerek yıkanır ve preperattaki fazlalıklar uzaklaştırılır
6. Karşı boya olarak kullanılan metilen mavisi preperasyonun üzerini kaplayacak şekilde dökülerek 1 dakika beklenir.
7. Preperat sudan geçirilerek yıkanır.

Yaymaların değerlendirilmesi

Kurutulan preperat 100X immersiyon objektifi kullanılarak mikroskopda mavi zeminde kırmızı basillerin varlığı yönünden incelenir. Mikroskopta negatif sonucun bildirilmesi için en az 100 sahanın incelenmesi önerilir. Karbol fuksinle boyanmış yaymalarda mikobakteriler tipik olarak 1-10 µm uzunluğunda ve 0.2-0.6 µm çapında kırmızı çomaklar ve sıklıkla zincir ya da çomak şeklinde bazense kokkoid yada filamentöz biçimlerde gözükürler. Genel olarak mikobakterilerin mikroskobik görünümü hafif kıvrık çomaklar şeklinde olmaktadır. Artafaktlar,bazı Nocardia türleri bazı bakteri ve fungal sporlar da aside dirençli olarak boyanabilirler. Daha önce ARB pozitif bir preperat incelenmişse yerinden çıkan ARB'ler immersiyon yağı aracılığıyla objektife bulaşabilir, bu da daha sonra incelenen preperatta hatalı pozitif sonuçlara neden olabilir.

Sonuçların rapor edilmesi

ARB içeren bir preperat incelendiğinde ARB pozitifliğinin temsili ortalamasını elde etmek için yeterince saha incelenmelidir. Her bir mikroskop sahasındaki ARB'ler sayılır. Her bir bakteri kümesi 1 koloni oluşturan ünite (CFU)'yi temsil eder bu nedenle her bir küme 1 ARB olarak değerlendirilmelidir. ARB'lerin sayısının rapor edilmesinde CDC (Center for Disease Control)'nin önerdiği rapor yöntemi şu şekilde özetlenebilir [17].

Gözlenen ARB sayısı	Rapor
300 sahada 1-2 ARB	+/-*
100 sahada 1-9 ARB	1 +
10 sahada 1-9 ARB	2 +
Her sahada 1-9 ARB	3 +>
Her sahada 9 ARB	4 +

* Morfolojik olarak uyumsuz olan (Nocardia, fungal sporlar, hücresel kalıntılar gibi) aside dirençli boyanmış oluşumlar ARB yönünden pozitif olarak değerlendirilmemelidir.

Hatalı sonuçların rapor edilmesini önlemek açısından:

1. Yayma yeniden incelenebilir
2. Örnekten birden fazla yayma hazırlayıp boyayarak incelenebilir.
3. Sorunsal bulgular elde edildiğinde doktorun başka örneklerin incelenmesini isteyip istemediği sorulabilir.

Raporda belirtilmesi gerekenler

1. ARB görüldü ya da ARB görülemedi
2. ARB görüldüyse ARB sayısı (1 +, 2 +, ...,)
3. Raporda mikroskopik ayrımlarının mümkün olmamasından dolayı *Mycobacterium* tür ismi yazılmamalıdır. Pozitif raporda sadece ARB pozifliği belirtilmelidir.
4. Yaymaların incelenmesinde kullanılan yöntem (örneğin; Ziehl-Neelsen boyama, Floresan mikroskopi) raporda belirtilmelidir.

Buna göre:

Negatif rapor örneği: ZN boyamada ARB görülemedi

pozitif rapor örneği: ZN boyamada 3 + ARB görüldü.

3. Kinyoun Yöntemi: ZN yönteminden farklı olarak karbol fuksin ısıtılmadan 3 dakika uygulanır ve zıt boya olarak malaşit yeşili kullanılır. Mikroskopta yeşil zemin üzerinde kırmızı basiller şeklinde görülürler.

B. Kültür yöntemleri

Mikobakterilerin kültürü katı ve sıvı besiyerlerinde yapılabilmektedir. Katı ortamlarda yapılan kültürlerin en avantajlı tarafı; *M. tuberculosis*'in nontüberküloz bakterilerden ayırdedilmesinde önemli yeri olan koloni

morfolojilerinin ve pigmentasyonun gözlenmesine olanak tanımasıdır. Steril vücut sıvılarının dışında normal bakteri florasıyla kontamine olabilen balgam gibi örneklerin antimikrobik içeren seçici besiyerlerine ekilmesi uygundur. Kültürler 35-37° C'de % 5-10 CO_2 içeren atmosfer koşullarında inkübe edilir. Kütanöz bölge örneklerinden ikinci ekimler yapılmalı ve bunlar da 30 °C'de inkübe edilmelidir.

M. tuberculosis'in jenerasyon süresi 15-20 saat gibi uzun bir süreyi aldığından üremesi de yavaş olmaktadır. Katı besiyerlerinde (LJ'de) üremesi 3-6 hafta sürmesi nedeniyle kültürler haftada bir mikobakteriyel üreme yönünden incelenmelidir. Bu süre sıvı besiyerlerinde otomotik sistemlerde 2-10 güne kadar düşmektedir.

Günümüzde geleneksel yöntemlerden ayrı olarak, mikobakterilerin metabolizmaları sırasında ürettikleri CO_2'in 14C ile işaretlenerek saptanması temeline dayanan, yaklaşık on gün içinde sonuç veren Bactec gibi hızlı broth sistemleri, ayrıca mikobakterilerin klinik materyalde varlığının daha hızlı bir şekilde tanımlanmasına yönelik olarak nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, ticari kemilüminesan, kromatografik yöntemler kullanılmaktadır [27].

TB basillerinin klinik örneklerden izolasyonunda izlenecek yollar Tablo 3'de özetlenmeye çalışılmıştır:

Tablo 3. Tüberküloz Basillerinin Tanısında İzlenecek Yollar [17,18]:

KLİNİK ÖRNEK	
A. Steril ise	**B. Steril değilse**
Santrifüj edilir (bulunması olası mikobakteriler yoğunlaştırılır) ve elde edilen çökeltiden: • Sıvı b.y ekim yapılır • 37^{0}C'de 4-8 hafta inkübe edilir. • Üreme olursa ARB aranır	NaOH ile dekontaminasyon yapılır. Tampon ya da su ile nötralize edilerek 3000 devirde santrifüjlenir ve elde edilen çökeltiden: • ARB görmek amacıyla ZN boyama ve bakteri üretmek amacıyla bir sıvı (Dubos gibi), bir de katı (LJ gibi) besiyeri'ne ekim yapılır. • 37^{0}C'de 4-8 hafta inkübe edilir • Koloni oluşmuşsa ARB aramak için boya yapılır • Sıvı besiyerinde üreme varsa katı besiyeri'ne pasaj yapılır.

C. Hayvan deneyleri: *M. tuberculosis* ve M. bovis tanısında kobaylar ve tavşanlar denek olarak kullanılmaktadır. Kobaylar *M. tuberculosis* ve M. bovis'e duyarlı; Tavşanlar ise M. bovis'e duyarlı *M. tuberculosis*'e dirençli olduğundan iki mikobakteri türünün ayırdedilmesinde ve tanısında bu özellikten yararlanılmaktadır [14].

D. *Mycobacterium tuberculosis*'in ilaç direnci ve In-vitro antimikrobiyal duyarlılığının araştırılması:

Mycobacterium'ların hücre duvarındaki mikoloid-arabinogalaktan yapısında fazla miktarda bulunan lipidler nedeniyle boyaların ve ilaç moleküllerinin hücreye girişi engellenmektedir [28, 29]. *Mycobacterium* suşlarında ilaç direnci mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir [30]. *M. tuberculosis*'de klasik antitüberkülo ilaçlara ve son yıllarda tedavide kullanılması önerilen florokinolonlara karşı dirençle ilişkili bazı genler saptanmıştır. Aşağıdaki Tablo'da *M. tuberculosis*'in çeşitli antitüberkülo ilaçlara karşı direnç kazanmasında rol oynayan genleri özetlenmiştir [19, 31].

Tablo 4. *M. tuberculosis*'in ilaç direnciyle ilişkili olan genler

Antimikrobik	Dirençle ilişkili Gen
RIF	RproB (RNA polimerazın B alt ünitesi)
INH	Kat G (katalaz-peroksidaz) InhA (enoil-ACP redüktaz) AhpC (alkalen hidroperoksit redüktaz)
SM	RpsL (ribozomal protein S12) Rrs (16S ribozomal RNA)
EM	EmbAB (arabinozil transferaz)
PZA	PncA
OFX	GyrA (DNA girazın A alt ünitesi)

Ortaya çıkan dirençli suşlar, TB tedavisinde sorunların yaşanmasına neden olduğundan antimikrobik dirençlerinin araştırılması gerekmektedir. M. tuberculosis'in antimikrobiyal duyarlılığının araştırılması 3 nedenle önemlidir:

1. Elde edilen sonuçlar tedaviye başlanmasında kılavuzluk eder.
2. Tedavisinde olumlu sonuçların alınamadığı hastalardan soyutlanan suşların ilaçlara direncinin olduğunu doğrular.
3. Pirimer ve toplumda kazanılmış ilaç direncinin değerlendirilmesinde önemlidir.

Duyarlılık araştırılmasında kullanılacak ilaçlar

A. Birinci seçenek ilaçlar: INH, SM, RIF, EM ve PZA.

B. İkinci seçenek ilaçlar: Capreomycin, cycloserine, ethionamide, para amino salisilik asid (PAS), kanamycin, ve son

zamanlarda TB tedavisinde önerilen amikacin, ciprofloxacin, clofazimine, ofloxacin ve sparfloxacin [32].

Mikobakterilerin ilaç duyarlılığının araştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntemler:

I. Direk yöntemler:

ARB pozitif balgam örneği antibiyotikl besiyerine ekilir. Uygun inkübasyon koşulları ve süresi sonunda üreme elde edilmesi bakterinin o ilaca dirençli; üreme olmaması duyarlı olduğunu gösterir [26].

II. İndirek yöntemler:

1. Geleneksel yöntemler:

Direnç-oran (Resistance Ratio) yöntemi: Hastadan izole edilen suşun ilaçlara direncinin, standart laboratuar suşun direnciyle karşılaştırmasına dayanan yöntemdir. İlaçların ikiye katlanan dilüsyonlarını içeren ortamlardan iki seri hazırlanır. Hem incelenecek (hastadan izole edilen) suşun hem de bilinen (standart suşun) standart inokülumlarıyla ilaç içeren besiyerlerine ekimleri yapılır. Sonuçta elde edilen test (hasta) suşunun MIC oranı standart suşun MIC oranına bölünerek direnç belirlenir. Standard duyarlı suş: *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) [33].

Proporsiyon yöntemi: ABD, Fransa ve Kanada'nın bazı yörelerinde yaygın olarak kullanılan bu yöntemde belli bir ilaca dirençli organizma oranı kesin sayı olarak saptanır. Bakterinin 100 kat sulandırılmış inokülümü hazırlanır. Bu inokülümden hem ilaç içermeyen kontrol hem de ilaç içeren test besiyerlerine ekimler yapılır. Bir dilüsyonda 50-100 koloni olmalıdır. Basillerin kullanılan antimikrobiğe direnç oranı ilaçsız kontrol besiyerlerindeki koloni sayılarının ilaçlı ortamlarda üreyen koloni sayılarıyla karşılaştırılarak belirlenir.

Direnç oranının hesaplanmasında; "ilaçta üreyen koloni sayısı/Kontrolde üreyen koloni sayısı X 100 = % direnç" formülünden yaralanılır [26].

Diğer geleneksel yöntemler: "Agar dilüsyon", "modifiye agar dilüsyon", "disk elüsyon" gibi duyarlılık testleri sık kullanılan geleneksel yöntemlerdir.

2. Radyometrik yöntemler (BACTEC)

a. Modifiye proportion yöntemi: Bu yöntemde sıvı besiyeri kullanılır. Üreme radyometrik olarak okunur ve sonuçlar 4-7 günde elde edilir.

b. PZA duyarlılık yöntemi: PZA *M. tuberculosis*'e karşı ancak düşük pH'da **(pH: 6.0)** etkili olan bir antimikrobiktir [34].

c. MIC tespiti: MIC bakteriyel popülasyonun % 99'undan fazlasını inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanır [26].

E. Yeni tanı yöntemleri: Geleneksel olarak mikobakterilerin tanısı; ZN yöntemiyle klinik örneklerde aside dirençli basillerin mikroskopta gösterilmesi ve kültür ortamında üretilmesi ile yapılmaktadır. Kültürde patojen mikobakterilerin üremesi 4-6 hafta gibi uzun bir süreyi alması, tedavide çeşitli sorunları da beraberinde getirmektedir. CDC kriterlerine göre; laboratuara gönderilen örnek sonuçlarının alınmasında ARB yaymaları için 24 saat, bakterinin kültürü ve identifikasyonu için 10-14 gün ve duyarlılık testleri için 15-30 gün süre önerilmektedir [35]. ARB yaymalarından sonuçların alınmasında bu süre daha da kısa olabilmekle birlikte kültür, identifikasyon ve duyarlılık sonuçlarının alınması önerilen süreden uzun olmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda yeni ve hızlı tanı tekniklerinin araştırılmasına çalışılmaktadır. Sonuçta bazı teknikler de geliştirilmiştir. Şu anda kullanılan yeni yöntemlerden bazılarını şu başlıklar altında toplamak mümkündür:

1. Radyometrik kültür yöntemleri: Bu yöntemde prensip olarak; Mikobakteriler tarafından C^{14} ile işaretlenmiş palmitik asitin metabolize edilmesi sonucu radyoaktif CO_2 oluşumu araştırılır. Bu temele dayalı olarak geliştirilmiş "BACTEC TB-460 System" gibi yöntemlerle mikobakteriyel izolasyon süresi 4-12 güne düşürülmüştür [36].

2. **Nükleik asit probları:** Mikobakterilere özgün DNA ve RNA propları kültürde üretilmiş mikobakterilerin tanısında kullanılmaktadır [37].

3. **Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri:** Bu yöntemlerde, klinik örneklerde enfeksiyon etkenleri saptanamayacak kadar düşük miktarlarda olduğunda söz konusu etkenlerin bir nükleik asit dizisi çoğaltılarak saptanabilir düzeye getirilmesi amaçlanır. Bu yöntemlerden günümüzde en sık olarak kullanılanı PCR (Polymerase Chain Reaction) olup ayrıca SDA (Strand Displacement Amplification) ve TMA (Transcription Mediated Amplification) gibi yöntemler de kullanılmaktadır [38, 39].

4. **Floresan yöntem:** Son zamanlarda klinik örneklerden mikobakterilerin izolasyonunda kullanılan hızlı tekniklerden birisidir. Bu yöntemde Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) içerisinde floresdan veren bir madde bulunmakta ve bu madde de mikobakterilerin üremesi sırasında kültür ortamında oksijenin tüketilmesi sonucu floresans oluşur. Günlük kontrollerle oluşan floresan, Wood lambası (365 nm dalga boylu UV ışınları altında) ile tespit edilir [40].

5. **Çeşitli hücresel enzimlerin saptanması:** Monosit, makrofaj ve T-lenfositleri gibi bazı hücrelerin gelişmesinde rolü olan adenozin deaminaz (ADA) enzimi tüberküloz menenjiti, tüberkoloza bağlı peritonit ve perikardit gibi hastalıklarda artış gösterir. Biyokimyasal olarak bu enzimin BOS ve plevra sıvısı gibi örneklerde varlığının gösterilmesi tanıda yardımcı bir kriterdir [41].

6. **Kromatografik tanı yöntemleri:** Gaz kromatografisi ve yüksek performanslı likid kromatografi (HPLC) gibi yöntemler özgün mikobakteriyel yağ asitlerinin araştırılmasını amaçlayan kromatografik yöntemlerdir. Genetik yapılarına göre mikrobiyal yağ asit profilleri (yağ asitlerinin sayısı, çeşitliliği ve yüzdesi) çevresel koşullar değişmedikçe aynı olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle yağ asit profilleri mikroorganizmaların tanısında ve taksonomik sınıflarının belirlenmesinde

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

bir gösterge olarak önem kazanmaktadır. Çalışmamızda mikobakteriyel tip tayini için, MIS cihazında gaz kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Bu sistem ile mikobakterilerden ekstrakte edilen yağ asiti metil esterlerinin profilleri sistemin kendi hafızasındaki bilinen mikobakteriyel yağ asiti profilleriyle karşılaştırılarak identifikasyon amaçlanmaktadır. Gaz likid kromatografisi ile *M. tuberculosis* kompleksinde % 77, M. avium kompleksi içinse % 83 doğrulukla identifikasyon yapıldığı bildirilmekte ve klasik yöntemlerden daha hızlı sonuç vermesi nedeniyle alternatif bir yöntem olabileceği düşünülmektedir [17, 20, 42, 43].

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

A. GEREÇLER

1. ***Mycobacterium* suşları**: Erzurum ve yöresinden Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yakutiye ve Aziziye Araştırma Hastanelerinin çeşitli klinik ve polikliniklerine başvuran akciğer tüberkülozu düşünülen olguların balgam örneklerinden Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuarlarında LJ besiyerlerinde üretilmişlerdir.
2. **Kullanılan besiyerleri:**
   a. LJ
   b. Dubos Tween-albumin buyyonu
   c. Mıddlebrook 7H-10 medium*
3. **Elektrikle çalışan araçlar:**
   a. Microbial Identification System (MIS)**
   b. Mikroskop
   c. Etüv
   d. Benmari
   e. Koagulatör
   f. Pasteur fırını
   g. Otoklav
   h. Buzdolabı
   i. Vorteks tüp çalkalayıcısı
   j. Distile su cihazı
4. **Cam araçlar:**
   a. Mum-kavanoz
   b. Lam
   c. Pipetler: 1 ml, 5ml, 10ml

d. Pasteur pipetleri

e. Steril deney tüpleri (burgulu kapaklı, 16x160 mm.)

f. Pamuk ya da parafinle kapatılmış steril tüpler (16x50 mm.)

g. Vidalı kapaklı cam tüpler

h. Gaz kromatografisi tüpleri (GC vial inserts; HP)**

i. Balonlar (250 ml., 500 ml., 1000 ml.)

j. Erlanmayer şişeleri

k. Steril cam boncuklar

5. Metal araçlar:

a. Lup öze

b. Tüp sporları

c. Duyarlı terazi

d. Bunzen beki

6. McFarland 1 no'lu eşeli: Duyarlılık denemesine alınacak olan *M.tuberculosis* suşlarının sulandırımları bu eşele göre hazırlanmıştır.

7. Kimyasal maddeler:

a. Erlich-Ziehl-Nielsen boya seti

b. Steril distile su

c. Gliserin

d. Tween 80

e. 1 N NaOH

f. OADC (Oleic acide-dextrose-citrate)*

8. Mikobakteriyel yağ asitlerinin saflaştırılmasında kullanılan çözeltiler:**

a. Çözelti 1: Saponification (hücre parçalayıcı) reaktifi:

NaOH (American Chemical Society -ACS- grade)	45 g
Metanol (High-pressure liquid chromatography –HPLC-grade)	150 ml
Saf su	150 ml

b. Çözelti 2: Methylation (metilasyon) reaktifi:

Hidroklorik asit (6.0 N)	325 ml
Metil alkol (HPLC grade)	275 ml

c. Çözelti 3: Extraction (saflaştırma) solventi:

Heksan (HPLC grade)	200 ml
Metil-tert-butil eter (MTBE, HPLC grade)	200 ml

d. Çözelti 4: Base wash (bazik yıkama:)

NaOH (ACS grade)	10.8 g
Saf su (deiyonize)	900 ml

e. Anhidroz sodyum sülfat

9. Mikobakteriyel yağ asitlerinin saptanmasında kullanılan gereçler:**

a. Hewlett-Packard 6890 series GC system

b. MIS software

c. *Mycobacterium* library ve yöntem software

10. Kağıt ve naylon araçlar:

a. Kurutma kağıtları

b. Parafin kağıtları

c. Maskeler

d. Eldivenler

11. Antimikrobikler: Toz halde aktif ilaç maddesi olarak üretici firmalardan temin edilmiş olup kullanılıncaya kadar orijinal ambalajları içerisinde buzdolabında tutulmuşlardır.

a. izoniazid

b. Rifampisin

c. Streptomisin

d. Ethambutol

e. Ofloksasin

Çalışmada kullanılan besiyerleri, kimyasallar ve diğer sarf malzemeler Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD kimyasal madde ve besiyeri depolarından temin edilmiştir.

* İşaretli maddeler 19 Mayıs Üniversitesi Tıp fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

** İşaretli maddeler Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Araştırma laboratuarlarından temin edilmiştir.

B. YÖNTEM

1. *Mycobacterium* suşlarının izolasyonu ve tanısı

Mikrobiyoloji ABD' da Nisan 1998-Aralık1999 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden *M. tuberculosis*'in izolasyonu amacıyla gönderilen balgam örneklerinin 55'inde üreme elde edilmiş ve rutin tanı yöntemleriyle (üreme ısıları, üreme süreleri, koloni mofolojileri ve pigment oluşturma gibi çeşitli özelliklerine göre) bu bakterilerin *M. tuberculosis* olduğuna karar verilmiştir. İzolasyon işlemleri için; steril erlen-mayer fincanlarında NaOH ile dekontaminasyona tabi tutulan balgam örnekleri HCl ile nötralize edilmiş ve 3000 devirde santrifüjlenmiştir. Elde edilen çökeltilerden LJ besiyerine öze ile ekimler yapılmış ve besiyerleri 37 ^{0}C' de 4-6 hafta inkübasyona bırakılmış, üremeler günlük olarak kontrol edilmiştir.

Ancak, daha sonra izole edilen bu suşların MIS cihazında gaz-kromatografisi yöntemiyle elde edilen yağ asit profilleri incelendiğinde, birisinin M. avium intracellulare, ikisinin de M.xenopi olduğu anlaşılmıştır. İzole edilen ve tanımlanan 55 mikobakteri suşu'nun sub kültürleri de yapılarak antimikrobik duyarlılık denemesinin yapılacağı ana kadar buzdolabında tutulmuşlardır.

2. Mikobakterilerin gaz kromatografi yöntemiyle tanımlanması : Bu işlemde, Lowenstein-Jensen besiyerlerinde üretilmiş ve rutin yöntemlerle *M.tuberculosis* olduğuna karar verilmiş izolatların Oleic acide – dextrose – citrate (OADC) katkılı Middlebrook 7H10 besiyeri içeren plaklara pasajları yapılarak 37°C'de elde edilen sub-kültürleri kullanıldı. İşlem çeşitli basamaklarla yürütülmüştür [20]:

a. Saponifikasyon (bakteri hücrelerinin parçalanması) basamağı: Saponifikasyon reaktifinden (1. çözelti) steril bir pipetle alınarak V tabanlı 13X100 ml.'lik steril cam tüplere aktarıldı. Tüpler teflon kaplı kapaklarla sıkıca kapatıldı. Bakterilerin inoküle edileceği tüplerin hangi suşa ait olduğu etiketlenerek içerisine standart lup (10 µl'lik) steril öze ile bir öze dolusu bakteri inoküle edilip sıkıca kapatıldı. Tüpler vortekste 10 saniye kadar karıştırıldıktan sonra kaynar su banyosunda (100 °C'de) 5 dakika tutuldu. Isıtma işleminden sonra tekrar tüp çalkalayıcısında 10 saniye kadar karıştırılıp, oluşan kabarcıkların giderilmesi amacıyla tekrar su banyosunda 5-10 saniye kadar ısıtıldı ve oda sıcaklığında soğuması beklendi. Böylece tüpler içerisinde bakteri hücrelerinin parçalanması sağlandı.

b. Metilasyon basamağı: Soğuyan tüplerin içerisine 2 ml metilasyon reaktifi (çözelti 2) ilave edilerek kapakları sıkıca kapatıldı. Tüpler vortekste 5-10 saniye kadar karıştırılıp 80 °C'lik su banyosunda 10 dakika ısıtıldıktan sonra ilk basamakta olduğu gibi oda sıcaklığında tutularak soğutuldu.

c. Ekstraksiyon (saflaştırma) basamağı: Tüplere 1.25 ml ekstaksiyon çözeltisi eklenerek kapakları sıkıca kapatıldı ve hemotokrit

çalkalayıcısında 10 dakika çevrilerek karışması sağlandı. Herbir örnek için yeni bir cam pasteur pipeti kullanarak tüpün dip kısmındaki aköz faz uzaklaştırıldı. Her bir tüpe 3 ml. bazik yıkama çözeltisinden ilave edilerek kapakları sıkıca kapatıldı. Hemotokrit çalkalayıcısında 5 dakika çevirerek tüp içeriğinin karışımı sağlandı. Her bir örnek için her defasında yeni pipetler kullanarak tüpün üstündeki sıvının 2/3'ü alınıp 0.3 ml anhidroz sodyum sülfat içeren şişelere aktarıldı. Şişelere aktarılan sıvı 2-3 kez pipetlenerek karışması sağlandı. Elde edilen berrak çözelti pipetle alınarak örnek şişelerine aktarıldı

d. Kromatografik analiz: Değişik suşlara ait örnek şişeleri kromatografi cihazına yerleştirilerek otomatik olarak yağ asitleri profilleri yönünden analiz edildi. Sonuçlar, elde edilen ekstrakttaki mikobakteriyel yağ asitleri ile kompütürde programlanmış mikobakteri türlerine özgü yağ asiti profilleri kütüphanesiyle karşılaştırılarak elde edilmiştir.

3. Antimikrobik duyarlılık işlemi:

a. LJ besiyerlerine antimikrobiklerin eklenmesi: Klasik antitüberkülo ilaçlardan INH, RIF, SM ve EM'ün yanısıra bir florokinolon olan ofloksasinin literatür bilgilerine göre önceden belirlenmiş olan dozları (Tablo 5), LJ besiyeri koagulatöre konulmadan hemen önce hassas terazi ile tartıldı. INH, SM ve EM distile suda; RIF metanolde sulandırıldı. OFX ise önce 1 N NaOH ile eritilip ileri sulandırmalarında steril distile su kullanıldı. İlaçlar besiyerlerine eklendikten sonra besiyeri tüplerine önceden yapıştırdığımız etiketlere içerisindeki ilaç ve ilacın konsantrasyonu yazıldı. Hazırlanan besiyerleri duyarlılık işlemine alınıncaya kadar buzdolabında tutuldu ve en geç bir hafta içerisinde, hazırlanan standart bakteri süspansiyonları ile inoküle edildi.

Tablo 5. Duyarlılık Denemesinde Kullanılan İlaçlar ve Dozları (µg/ml) [17, 26, 44].

İlacın Adı	1.doz	2.doz	3.doz
İzoniazid	0.1	0.2	1.0
Rifampisin	10.0	20.0	40.0
Streptomisin	4.0	8.0	16.0
Ethambutol	2.0	4.0	8.0
Ofloksasin	0.25	0.50	1.0

b. Standart bakteri süspansiyonunun hazırlanması ve LJ besiyerlerine inokülasyon: LJ besiyerinde üretilmiş olan *M. tuberculosis* kolonileri steril koşullarda 3-5 koloni lup öze ile kazınarak alındı ve içerisinde altı adet cam boncuk ve 4 ml Dubos Tween-albumin buyyonu bulunan lastik tıkaçlı steril deney tüplerine aktarıldı. Bakteri karışımı vorteks tüp çalkalıyıcısında yaklaşık 2 dakika karıştırıldı. Tüpler 30 dakika kadar dik şekilde tutularak karışımdaki büyük parçaların ve aerosollerin çökmesi sağlandı. Elde edilen homojen bakteri süspansiyonları aseptik koşullarda büyük deney tüplerine aktarıldı. Süspansiyonlar üzerine kademeli şekilde Dubos Tween-albumin buyyonu eklenerek; 1 nolu Mc Farland eşelinin bulanıklığı (yaklaşık olarak 10^7 CFU/ml) elde edildi. Mc Farland 1'e göre hazırlanan süspansiyonlardan ayıca steril saf su ile 10^{-2} ve 10^{-4} sulandırımlar hazırlandı. Deneyde kontrol organizma olarak kullandığımız ***M. tuberculosis*** **H 37 RV** İçin de aynı işlem yapıldı.

Hazırlanan standart bakteri süspansiyonlarından ve alt sulandıımlarından pastör pipeti ile alınarak antimikrobiklerin her konsantrasyonu için ikişer adet antimikrobikli ve ikişer adet de antimikrobiksiz LJ besiyerlerinin yüzeyine üçer damla damlatılarak ekim yapıldı. Besiyeri üzerindeki etiketlere ekimi yapılan bakterilerin numaraları ve ekim tarihleri yazıldı ve burgu kapakları hafif gevşek olacak şekilde kapatılarak mum-kavanoza yerleştirilip etüvde (36 ^{0}C) inkübe edildiler.

c. Sonuçlarının değerlendirilmesi: İnkübasyondaki besiyerlerinde üreme olup olmadığı ekimden bir hafta sonra her gün kontrol edildi. Kesin değerlendirmeler ekimden 30 gün sonra antimikrobiksiz ve antimikrobikli besiyerlerindeki koloni sayıları kıyaslanarak yapıldı. Antimikrobikli besiyerlerinde antimikrobiksiz besiyerlerinde olduğu gibi baskın bir üremenin görülmesi durumunda bakterinin ilgili antimikrobiğe **dirençli**; antimikrobikli besiyerlerinde koloni görülmemesi durumunda **duyarlı** olduğuna karar verildi. Antimikrobikli besiyerlerinde bakteri üremesi durumunda; direnç yüzdesi saptandı. Direnç yüzdesi saptanmasında aşağıdaki formül kullanıldı [26, 33].

İlaçlı besiyerinde üreyen koloni sayısı/Kontrol besiyerinde üreyen koloni sayısı X 100 = % direnç

Direnç yüzdesi 1 ve daha yukarıda bulunması durumunda o antimikrobiğe karşı denenen suş **dirençli**; 1'den düşük olması durumunda **duyarlı** olarak değerlendirildi.Direnç değerlendirmesinde; denenen suşun bir antimikrobiğe dirençli olduğuna karar verebilmek için o suşla ilgili LJ besiyerindeki kritik ilaç konsantrasyon değerleri baz alınmıştır [17, 26, 44]. Bu tanımlama ile o antimikrobiğe duyarlı tüm mikobakterilerin üremesinin baskılandığı ancak ortamda bulunan dirençli mikobakterilerin ise üremesine izin veren ilaç konsantasyonu anlaşılmaktadır. LJ besiyerinde çeşitli antimikrobiklerin kritik konsantrasyonları tablo 6'da görülmektedir. Ayrıca 10^{-2} ve 10^{-4} dilüsyonlardan hazırlanan inokulumlara ait üremelerde, koloni sayıları ve dilüsyon katsayılarının çarpımları ile bulunan sayılar arasında uyumsuzluk olması durumunda o suşa ait inokulum tekrar hazırlandı.

Tablo 6. LJ besiyerinde çeşitli antimikrobiklerin kritik konsantrasyonları

INH	0.2
RIF	40
SM	4.0
EM	2.0
OFX	0.5-0.78 (Mic 90'a göre)

4. BULGULAR

M. tuberculosis izolasyonu amacıyla Ocak-1998 - Aralık-1999 yılları arasında çeşitli kliniklerden gönderilen balgam örneklerinin LJ besiyerlerinde yapılan kültürlerinde üretilen 55 suşa, rutin tanı yöntemleriyle *M. tuberculosis* tanısı konulmuştur. Ancak, izole edilen bu suşların gaz-kromatografi yöntemiyle elde edilen yağ asitleri profillerine göre birisinin MAC kompleksi mikobakteri, ikisinin de *Mycobacterium xenopi (M. xenopi)* olduğu anlaşılmıştır.

M. tuberculosis tanısı konulan 52 suşun antitüberkülo ilaçlara ve ofloksasine direnç sonuçları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. *M. tuberculosis* suşlarının antitüberkülo ilaçlara ve ofloksasine direnç oranları

Antimikrobik	C1				C2				C3			
	Duyarlı		Dirençli		Duyarlı		Dirençli		Duyarlı		Dirençli	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
INH	46	88.5	6	11.5	50	96.1	2	3.9	51	98.1	1	1.9
RIF	46	88.5	6	11.5	51	98.1	1	1.9	52	100.0	0	-
SM	43	82.7	9	17.3	50	96.1	2	3.9	52	100.0	0	-
EM	50	96.1	2	3.9	52	100.0	0	-	52	100.0	0	-
OFX	51	98.1	1	1.9	52	100.0	0	-	52	100.0	0	-

C1: Birinci Antimikrobik Konsantrasyonu (SM ve EM için kritik konsantrasyon)

C2: İkinci Antimikrobik Konsantrasyonu (INH ve OFX için kritik konsantrasyon)

C3: Üçüncü Antimikrobik Konsantrasyonu (RIF için kritik konsantrasyon)

Klasik antitüberkülo ilaçlar ve ofloksasine düşük ilaç konsantrasyonlarında direnç gözlenmesine rağmen, önerilen kritik ilaç konsantrasyonlarında (Tablo 6) SM'ye (4 µg/ml'de) % 17.3, INH'e (0.2 µg/ml'de) % 3.9, EM'e (2.0 µg/ml'de) % 3.9, ilaç direnci saptanmış, RIF (40.0 µg/ml'de) ve OFX'e (0.5 µg/ml'de) ise Kritik MIC (Minimal Inhibitory Concentration) değerlerinde direnç gözlenmemiştir.

Tablo 8 ve Tablo 9'da ikili ve üçlü kombinasyonlarda izolatların direnç oranları verilmiştir. Erzurum ve yöresinden izole ettiğiz *M. tuberculosis* suşlarının tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçların kombinasyonlarına karşı elde ettiğimiz in-vitro duyarlılığın yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 8. *M. tuberculosis* suşlarının ikili antimikrobik kombinasyonlarına dirençli bulunan sayıları

Kombinasyonlar	C_1	C_2	C_3	CK
INH + RIF	1	0	0	0
INH + SM	1	0	0	1
INH +EM	1	0	0	1
INH + OFX	0	0	0	0
RIF + SM	5	0	0	0
RIF + EM	1	0	0	0
RIF + OFX	0	0	0	0
EM + SM	1	0	0	1
EM + OFX	0	0	0	0
OFX + SM	1	0	0	0

C1: Birinci Antimikrobik Konsantrasyonu (SM ve EM için kritik konsantrasyon)
C2: İkinci Antimikrobik Konsantrasyonu (INH ve OFX için kritik konsantrasyon)
C3: Üçüncü Antimikrobik Konsantrasyonu (RIF için kritik konsantrasyon)
CK: Kritik konsantrasyon

Tabloda görülen kritik ilaç konsantrasyonlarında INH + SM, INH +EM ve EM + SM ikili kombinasyonlarında elde edilen ilaç direnci yalnızca bir suş ile ilgili bulunmuş; diğer suşlarda ikili ilaç direnci saptanamamıştır.

Kritik ilaç konsantrasyonlarında üçlü ilaç kombinasyonlarına ise yalnızca bir suş (INH+SM+EM kombinasyonunda) dirençli olarak bulunmuştur (Tablo 9).

Tablo 9. *M. tuberculosis* suşlarının antimikrobiklerin üçlü kombinasyonlarına dirençli bulunan sayıları

Kombinasyonlar	C_1	C_2	C_3	CK
INH + RIF + SM	1	0	0	0
INH + RIF + EM	1	0	0	0
INH + RIF + OFX	0	0	0	0
INH + SM + EM	1	0	0	1
INH + SM + OFX	0	0	0	0
INH + EM + OFX	0	0	0	0
RIF + SM + EM	1	0	0	0
RIF + SM + OFX	0	0	0	0
RIF + EM + OFX	0	0	0	0
SM +EM + OFX	0	0	0	0

C1: Birinci Antimikrobik Konsantrasyonu (SM ve EM için kritik konsantrasyon)
C2: İkinci Antimikrobik Konsantrasyonu (INH ve OFX için kritik konsantrasyon)
C3: Üçüncü Antimikrobik Konsantrasyonu (RIF için kritik konsantrasyon)
CK: Kritik Konsantrasyon

Dörtlü direnç (INH + RIF + SM + EM) sadece 1 suş'ta (1 no'lu suş) ve ilaçların ilk konsantrasyonları ile ilişkili olmuştur. Kritik konsantrasyonlar dikkate alındığında dörtlü ilaç direnci görülememiştir.

M. xenopi tanısı konulan iki suşa (47 ve 48 no' lu suşlar) ait direnç sonuçları ise Tablo 10'da verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi 47 no'lu

suş, tüm antimikrobikler için kritik konsantrasyonlara duyarlı; 48 no'lu suş ise INH ve RIF'e tüm konsantrasyonlarında dirençli bulunmuştur.

Tablo 10. *M. xenopi* suşlarının antitüberkülo ilaçlara ve ofloksasine direnç sonuçları

Antimikrobik	47. No'lu suş			48. No'lu suş		
	C_1	C_2	C_3	C1	C2	C3
INH	R	S	S	R	R	R
RIF	S	S	S	R	R	R
SM	S	S	S	S	S	S
EM	S	S	S	S	S	S
OFX	S	S	S	S	S	S

C1: Birinci Antimikrobik Konsantrasyonu (SM ve EM için kritik konsantrasyon)

C2: İkinci Antimikrobik Konsantrasyonu (INH ve OFX için kritik konsantrasyon)

C3: Üçüncü Antimikrobik Konsantrasyonu (RIF için kritik konsantrasyon)

R: Resistant = Dirençli,S: Sensitive = Duyarlı

M. avium/intracellulare tanısı konulan suş (14 no'lu suş) ise denenen tüm antimikrobiklere duyarlı bulunmuştur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde sosyo ekonomik seviye düşüklüğü, TB'nin endemik olduğu bölgelerden yapılan göçler, immün yetmezlik nedeni olan HIV enfeksiyonlarındaki artış, TB tedavisinin düzensiz yada eksik başlanması, alkol ve ilaç bağımlılığı, evsizlik, yurtsuzluk, mahkumluk gibi çeşitli risk olduğu kabul edilen faktörlerin varlığı; TB'un gelişmiş ve gelişmekte olan pek çok ülkede tırmanışa geçmesine neden olmuştur [45-51].

Tanı ve tedavisinde elde edilen tüm ilerlemelere rağmen TB, dünyada mortalite ve morbiditesi en yüksek olan enfeksiyon hastalıklarından birisidir [52]. DSÖ 1999 yılı verilerine göre, 1997 yılında yaklaşık 3.3 milyon tüberküloz olgusu bildirilmiş ve hastaların 1.3 milyonuna yakınında ARB yayma pozitifliği saptanmıştır. Ancak gerçek tüberkülozlu olgu sayısının bu rakamın çok üzerinde (7.9 milyon kadar) olduğu tahmin edilmektedir. Aynı raporda tahmini tüberküloz insidansı dünyada 100 binde 136, tüberküloz açısından yüksek riskli kabul edilen 22 ülkede ise 100 binde 174 düzeyinde olduğu bildirilmiştir [16].

Türkiye'nin de içerisinde yer aldığı gelişmekte olan ülkelerde antitüberkülo ilaçlara karşı ortaya çıkan direncin, TB'un tedavisinde ve kontrol altına alınmasında önemli sorunlara neden olduğu bilinmektedir. Yurdumuzda TB enfeksiyonlarının epidemiyolojisine ilişkin çalışmaların yetersiz olduğu ve bildirilen rakamların güvenirliğinin de düşük olduğu ifade edilmektedir [53].

Yine de, ülkemizdeki TB'un epidemiyolojisi ve antitüberkülo ilaçlara karşı TB basillerinin direnci hakkında önemli bilgiler ve ipuçları veren yayınlara rastlanmaktadır. Bunlardan birisinde, 1984-1995 verileri karşılaştırılmış ve her yıl yaklaşık 20-27 bin arasında yeni tüberküloz olgusunun beklendiği bildirilmiştir [54]. DSÖ verilerinde, 1996 yılı için Türkiye ile ilgili olarak yıllık resmi TB'lu olgu sayısının 1984-1995 yıllarında bildirilen sayılara oranla bir miktar düştüğü görülmektedir (Tablo 11).

Tablo 11: Türkiye'de yıllara göre yeni tüberküloz olgu sayıları [16, 54]

Yıl	Yeni olgu sayısı
1984	27530
1986	31030
1988	27881
1990	24941
1992	25455
1993	25455
1995	22981
1996	20212

Tüberküloz kontrolündeki temel sorun, önerilen ilaçların hastalar tarafından düzenli bir şekilde kullanılıp kullanılamadığının bilinememesidir. Düzensiz yapılan tedavilerin ve hasta uyumunun iyi olmamasının tüberkülozda kronikleşme ve direnç gelişimine neden olabileceği belirtilmektedir [55, 56].

WHO ve IUALTD tarafından önerilen ve DOTS stratejisinin elemanlarından bir tanesi olan DOT (Directly Observed Treatment = Direkt Gözlem Altında Tedavi) TB tedavisinde tüm dünyada yaygınlaşarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin prensibi hastaya verilen her doz ilacın gözetim altında içirilmesidir [16, 24]. DSÖ'nün tüberküloz kontrol stratejisi olan DOTS'un amacı, semptomatik ve balgam çıkaran hastalardan yapılan balgam yaymaları pozitif olguların saptanarak ilgili sağlık birimlerine rapor edilmesini; yayma pozitif olguların tamamına yakınına kısa süreli standart bir tedavi programının en mükemmel şekilde uygulanmasını; gerekli olan antitüberkülo ilaçların sağlanmasında kesinti olmayacak şekilde düzenli bir ilaç destek sisteminin kurulmasını ve tedavi sonuçlarının değerlendirilmesine olanak sağlayan standart kayıt ve rapor sisteminin yerleştirilerek kullanılmasını tüm dünyada yaygınlaştırmaktır [16].

DSÖ 1997 yılı verilerine göre, 1994 yılında tedaviye alınan hastaların DOTS tedavi stratejisi uygulananlarında % 76.5, uygulanmayanlarında ise % 41.2 oranlarıda tedavi başarısı elde edildiği bildirilmektedir. Klasik antitüberkülo ilaç tedavisi uygulanan hastalarda 1980-1986 yılları arasında gözlenen nüks, primer ve sekonder ilaç direnci gelişimleri ile ÇİDTB (çok ilaca dirençli tüberküloz) olgu oranları, 1986-1992 yıllarında DOT tedavisi uygulanan hasta grubuyla karşılaştırılmış ve ikinci grubta anlamlı bir düşme olduğu rapor edilmiştir [24].

DSÖ 1999 yılı raporunda ise, 1997 yılında altı DSÖ bölgesinde bulunan tüberkülozlu olgu popülasyonunun % 34.8'inde DOTS uygulanmış, % 60.1'inde DOTS uygulanmamış, % 5.1'inde ise veri gelmemiştir. Aynı raporda 1996 yılında TB için yüksek riskli kabul edilen 22 ülkede yapılan değerlendirmeye göre tedavi başarısı DOTS uygulayanlarda % 78, uygulamayanlarda % 39 olarak bildirilmiştir. Global rakamlara bakıldığında; altı DSÖ bölgesinde DOTS uygulayanlarda kür oranı % 71.6 ve tedavi başarısı % 78.4 iken uygulamayanlarda kür oranının % 16.8 ve tedavi başarısının % 38.6 gibi düşük düzeyde kaldığı saptanmıştır [16].

DSÖ'nün 1994 ve 1997 verileri karşılaştırılacak olursa bu süreç içerisinde DOTS uygulayanlarda elde edilen tedavi başarısı (% 2'ye yakın bir oranda) artmış, oysa DOTS uygulamayanlarda ise tedavi başarısı (% 1.2 oranında) aksine düşmüştür. Bu sonuç stratejik tedavi uygulamalarının önemini çarpıcı bir şekilde yansıtmaktadır.

Toplumda izole edilmemiş ve önlemi alınmamış her TB hastası, yeni TB'lu daha sonra da eski dirençli olgular olarak enfeksiyon zincirine eklenecektir. Bu süreç mikobakteriyal çalışmalarda hızlı ve güvenilir yeni tanı ve duyarlılık yöntemlerinin aranmasına yol açmıştır [11, 36, 57, 58].

Günümüzde özel radyolojik görünümlerle TB'un tanısında önemli sonuçlar elde edilmesine rağmen kesin tanı klinik örneklerin direk mikroskopik incelemesi, kültür yapılarak ya da deney hayvanları

kullanarak TB basillerinin görülmesi ya da üretilmesi ile konulmaktadır. Kesin tanı sağlayan mikrobiyolojik yöntemlerden sonuç alınması için belli bir süre gerekmektedir. Gerekli laboratuar çalışmalarının yerine getirilmesi için CDC tarafından mikobakteriyoloji laboratuarlarına en fazla 30 gün süre önerilmektedir [35].

Çalışmamızda, daha önce klasik yöntemlerle tümü *M. tuberculosis* olarak tanımlanmış 55 suşun tür tayinini kısa sürede sonuç verebilen MIS'de gaz kromatografisi yöntemiyle de araştırılmıştır [17, 20, 42, 43]. Bu yöntemde elde edilen bakteri yağ asitleri profillerine göre bir suş MAC kompleksi mikobakteri, iki suş da *Mycobacterium xenopi (M. xenopi)* olarak belirlenmiştir.

Daha ucuz olmasına rağmen klasik yöntemlerde, ekipman ve deneyimli elaman eksikliği gibi daha pek çok faktöre bağlı olarak tanımlama hataları yaşanabilmekte ve tedavide hatalı ya da olumsuz sonuçlara neden olabilmektedir.

TB'un tanısı etiyolojik ajanın izolasyonu ve identifikasyonuna bağlı olsa da, uygun tedavinin planlanması ancak antitüberkülo duyarlılık testlerinin yapılması ile mümkündür [59].

Bu amaçla, TB'lu hastalardan izole ettiğimiz *Mycobacterium* suşlarının antimikobakteriyel direnç paternleri araştırılmıştır. Elimizde çalışmamıza kabul ettiğimiz olgular ile ilgili yeterli klinik bilgi olmadığından TB olgularındaki dirençlerin, primer ve sekonder olarak sınıflandırılması yapılamamıştır.

Çalışmamızda test ettiğimiz klasik antitüberkülo ilaçlar ve ofloksasine düşük MIC konsantrasyonlarında direnç gözlenmesine rağmen, önerilen kritik ilaç konsantrasyonları dikkate alındığında SM'ye (4 µg/ml'de) % 17.3, INH'e (0.2 µg/ml'de) % 3.9, EM'e (2.0 µg/ml'de) % 3.9, ilaç direnci saptanmış, RIF'e (40.0 µg/ml'de) ve OFX'e (0.5 µg/ml'de) ise ilaç direnci gözlenmemiştir (Tablo 7).

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Kritik ilaç konsantrasyonlarının ikili kombinasyonlarında (INH + SM, INH +EM ve EM + SM) elde edilen ilaç direnci (Tablo 8) ile üçlü ilaç kombinasyonuna (INH+SM+EM'e karşı) direnç sadece bir suşla ilgili olarak tesbit edilmiştir (Tablo 9).

Çalımamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, Erzurum ve yöresinden izole edilen *M. tuberculoss* suşlarına karşı klasik antitüberkülo ilaçlar içerisinde RIF'in ve genel değerlendirmeye göre ise RIF ve OFX'in en etkili ilaçlar olduğu buna karşın SM'nin en etkisiz antitüberkülo ajan olduğu tespit edilmiştir.

Arseven ve ark [53] Doğu Karadeniz Bölgesinde yaptıkları kapsamlı araştırmalarında 1388 kültür pozitif TB'lu hastanın % 40.6'sında INH, RIF ve EM'den herhangi birine karşı direnç saptadıklarını, % 59.4'ünde ise TB basillerinin tüm ilaçlara duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ilaçların her birine karşı toplam direnç oranları INH için % 29.6, SM için % 23.3, RIF için % 17.1 ve EM için % 8.8 olarak rapor edilmiştir.

İzmir'de 1989-1992 yılları arasında LJ besiyerinde proporsiyon yöntemiyle yapılan duyarlılık denemesinde primer antitüberkülo ilaç direnci % 41 oranında saptanmıştır. İzolatların % 9'u INH'e % 3 `ü EM'e, % 32 si SM'e %27'si RIF`e dirençli bulunmuştur [60]. Araştırmacılar diğer ülkelerin direnç oranları ile kıyasladıklarında yurdumuzda elde edilen direnç oranlarının yüksekliğini ülkemizdeki tüberküloz savaşındaki kopukluklara, bilgi ve deneyim eksikliklerine ve ihmal edilmişliğe bağlamışlardır.

Trakya Bölgesinde yapılan çalışmada Karabay ve ark [61] 214 *M. tuberculosis* izolatından yarısına yakınının en az bir ilaca, üçte birine yakınının da birden fazla ilaca dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada toplam direnç oranları SM için % 29.0, INH için % 27.1, RIF için % 21.5, EM için % 10.3 olduğu; INH, RIF, SM, EM ve INH+RIF' e karşı primer direnç oranları sırasıyla % 15.3, % 8.5, % 11.0, % 3.4 ve % 2.5, sekonder ilaç direnci oranları ise % 41.7, % 37.5, % 51.0, % 18.8 ve % 22.9 olarak bildirilmiştir. Çalışmada bulunan direnç oranları yüksek olarak

değerlendirilmiş ve bu yüksekliğin nedeni olarak; TB olgularının yeterince izlenmemesi, TB tanı ve tedavisinin koordinasyonunun ve bakteriyolojik incelemelerin yetersizliği, düzensiz ilaç kullanımı, personelin eğitim ve motivasyon eksikliği, olguların takip ve denetiminin yetersizliği gibi faktörler gösterilmiştir. Bizim elde ettiğimiz direnç oranları bu çalışmadaki hem primer hem de sekonder ilaç direnç oranlarından daha düşüktür.

Çoban ve ark [62] Samsun'da yaptıkları çalışmada INH, RIF, EM, SM'e karşı *M. tuberculosis* izolatlarının duyarlılıklarını proporsiyon yöntemiyle araştırmışlar ve suşların % 2'sinde INH'e, yine % 2'sinde EM'e ve % 6'sında birden fazla ilaca direnç saptamışlardır.

Aydın ve ark [63] Bursa'da yaptıkları çalışmalarında 1995-1997 yılları arasında izole ettikleri *M. tuberculosis* complex suşunda INH direncini % 22.2, RF direncini % 7.4 ve SM direncini % 4 olarak tespit etmişlerdir.Bu çalışmada saptanan direnç dağılımının yıllara göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği rapor edilmiştir.

Emekdaş ve ark [64] İstanbulda 83 TB basili üzerinde gerçekleştirdikleri duyarlılık denemesi sonucunda SM'e direnç tespit edememişler buna karşın INH, RIF ve EM için yüksek sayılacak oranlarda direnç elde etmelerinden dolayı antibiyogram işleminin yapılamadığı durumlarda tedaviye kesin yanıt alınabilmesi için SM'in kombinasyona dahil edilmesi gerektiği üzerinde durmuşlardır.

Yorgancıoğlu ve ark [65], 1988-1992 yıllarında 3748 hasta üzerinde yaptıkları duyarlılık testlerinde primer ve sekonder RIF direnç oranlarını % 9.2 ve % 29.2 bulmuşlardır. INH için primer ve sekonder direnç oranları ise sırasıyla % 14.5 ve % 39.6 olarak tesbit edilmiştir.

Bakıcı ve ark [66] 1993 yılında yayınladıkları çalışmalarında 1987-1991 yılları arasında Sivas'ta izole edilen 226 *M. tuberculosis* suşunda INH için % 10.2, RIF için % 8.0, EM için % 4.9, SM için % 8.5 oranında direnç saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki veriler incelendiğinde

SM için elde edilen direncin eski yıllara oranla giderek arttığı; buna karşın diğer ilaçlarda bariz bir direnç artışının olmadığı anlaşılmaktadır.

Erciyes Üniversitesinde 1990-1994 yılları arasında LJ besiyeri ile duyarlılığı tesbit edilen 328 tüberküloz komplexi mikobakteri suşundan %35.3'ü SM'e, %33.2' si INH'e, %20.1'i RIF'e, %5.5'i ise EM'e dirençli bulunmuştur.1994-1997 yılları arasında ise aynı hastanede Bactec TB sistemi ile üretilip duyarlılığı çalışılan 152 suşun dirençlilik oranları ise sırasıyla RIF'e %22.1, SM'e %10.1, INH'e %7.3 ve EM'e %4.6 olarak tesbit edilmiştir. Konvensiyonel yöntemlerde kullanılan Lowenstein jensen besiyerinde yapılan duyarlılık testlerinde en yüksek direnç SM ve INH'e, Bactec TB sistem ile de RIF'e karşı bulunmuştur [67]. Son yedi yıl içerisinde değişik iki yöntem uygulanarak gerçekleştirilen duyarlılık testlerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklılığın gerçekten yöntemden mi yoksa BACTEC sistemi ile denenen *M. tuberculosis* suşlarının ilaç duyarlılığının yüksek oluşundan mı kaynaklandığı anlaşılamamıştır? Kayseri'de yapılan çalışmalarda bulunan EM direnci ile bizim elde ettiğimiz % 3.9'luk direnç oranı birbirine yakın değerlerdir. Suşlarımızın % 17.3'ünün SM'e dirençli olması ile Verem Danışma Kurulu Sağaltım Komisyonu Raporunda belirtilen primer rezistansın yüksek olduğu ülkelerde, yeni başlanan TB tedavisinde SM yerine EM tercih edilmesi görüşünü destekler yöndedir [23].

Balcı ve ark [68] Gaziantep'te 1994-1998 yılları arasında BACTEC TB 460 sistemi ile izole edilen toplam 199 *Mycobacterium tuberculosis* suşunun yine aynı yöntemle SM, INH, RIF, EM'e duyarlılıklarını araştırmışlar; INH'e % 10.6, EM'e % 4.5, SM'e % 2.0 ve RIF'e % 0.5 oranında direnç saptadıklarlarını bildirmişlerdir.

Erzurumda daha önce yapılan bir araştırmada klasik antitüberkülo ilaçlardan SM'e %20.6, RIF'e %18.2, INH'e %12.5, EM'e %11.8 oranında direnç saptanmış ve bu dördü arasında en dirençli ilaç olarak SM tesbit edilmiştir. Çalışmaya alınan M.tuberculosis suşlarında oflaksasine karşı direnç gözlenmemiş ve suşların % 67.8' inin ilaçlara duyarlı olduğu görülmüştür [69]. Çalışmamızda benzer şekilde en dirençli ilaç olarak SM

bulunmuş ve ofloksasine karşı kritik konsantrasyonda direnç saptanamamıştır.

ABD'de 1991 yılında verilen bir raporda yeni tuberküloz olgularındaki ilaç direnci oranları INH'e % 8.2, RIF `e %3 .5, SM'e % 5.6 ve EM'e % 2.3 olarak saptanmıştır. Aynı rapora göre ABD'de INH+RIF direnci % 3.5 iken, New York şehrinde % 12.9 gibi farklı bir düzeyde bildirilmiştir [45]. Bu sonuç hastalığın epidemiyolojisinde ülkeler içinde bölgesel farklılıklarında etkili olduğunu göstermektedir.

Neville ve ark [70] 1971 ve 1991 yılları arasındaki dönemde 4681 tüberküloz hastasının ilaç duyarlılıklarını incelediklerinde INH + RIF direnç oranlarının %2.5'den, %16'ya kadar yükseldiğini tebit etmişlerdir. ÇİD-TB 20. yüzyılın son çeyreğinden günümüze kadar artış göstererek tedavide ciddi sorunlar doğurmuştur [71]. Bu tanımlama, INH+RIF yada bunlarla beraber ilaç yada ilaçlara dirençli basil çıkaran olgular için kullanılanılmaktadır [40]. Antitüberkülo ilaç duyarlılığını denediğimiz 52 adet *M. tuberculosis* suşunda kritik konsantrasyonlarda INH+RIF direnci rastlanmadı. Gerekli kritik konsantrasyonlarda birden fazla ilaca direçli olma durumu sadece bir suşta ve INH+SM+EM ile ilgili olarak bulundu.

CDC'nin 1991 yılına ait başlangıç verilerinde, yenileyen olguların % 6.9'unda, yeni olguların ise % 3.1' inde INH ve RIF direncine rastlanmıştır [71, 72].

New York'da 1991 yılında, kültür pozitif tüberkülozlu hastalarda yapılan direnç çalışmasında da INH ve RIF için direnç oranları sırasıyla % 26 ve % 22 olarak bildirilmiştir. Daha önceden tedavi görmüş hastaların, HIV enfeksiyonu taşıyanların, uyuşturucu bağımlılarının antitüberkülo ilaç direnç gelişiminde risk oluşturduğu ifade edilmiştir [46].

HIV epidemileriyle birlikte immun sistemi baskılanmış bireylerde fırsatçı mikobakteriyel enfeksiyon etkeni olarak MAC komleksi mikobakterin sıklıkla izole edildiği rapor edilmektedir [11]. Çalışmamızda bir

M. avium-intracellulare suşu izole edilmiştir. Ancak bu suşun izole edildiği hastanın klinik olarak immün sisteminin baskılanmış olup olmadığı konusunda bir veri yoktur.

Birleşik devletlerde 1993-1996 yılları arasında yapılan diğer bir çalışmada bu yıllar arasındaki antitüberkülo ilaç duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. Sonuçta INH direnci nispeten sabit kalırken, ÇİD tüberküloz oranının, yabancı doğumlu olanlarda, HIV (+) olanlarda daha önceden tüberküloz öyküsü bulunan hastalarda daha yüksek olduğu saptanmıştır [47].

Son yıllarda ÇİD-TB ve HIV taşıyıcılarında görülen TB olgularındaki artışlar yeni tedavi uygulamalarının aranmasına da neden olmuştur. ÇİD-TB tedavisinde ilk aylarda parenteral bir preparat ve de kinolonların yer almasını öneren yayınlar bulunmaktadır [44]. Bu nedenle biz de çalışmamızda kinolon grubu bir ilaç olan ofloksasini antitüberkülo ilaç duyarlılığı testlerinde kullandık.

Nükleik asid sentezini inhibe eden florokinolon grubu ilaçlar bakteriyel DNA gyraz enzimini hedeflemektedir. Dirençli suşlarda bu enzimi kodlayan Gyr A ve Gyr B genlerinde mutasyonlar saptanmıştır [73].

Bu konuda Fransa'da 1994 yılında yapılan bir çalışmada ofloksasin tedavisi sırasında gelişen ilaç direnci sebebi olarak Gyr A genindeki mutasyon gösterilmiştir. Tedaviden önce ofloksasin için 1 µg/ml olan MİC değerinin tedavi esnasında 32 µg/ml değerine yükseldiği bildirilmiştir [74]. Çalışmamızdaki suşlardan sadece birisi, ofloksasinin düşük konsantrasyonuna (0.25 µg/ml) direnç gösterse de MİC (90) değerleri (0.50-0.78 µg/ml) dikkate alındığında bu ilaca karşı direnç saptanamamıştır.

Berlin'de 1987-1993 yılları arasında 1011 kültür pozitif pulmoner tüberkülozlu hasta üzerinde antitüberkülo ilaç duyarlılık testleri çalışılmış ve toplam ilaç direnci % 9.7 olarak bulunmuştur. Daha önceden tüberküloz

tedavisi alan ve yaklaşık üçte birinin Türkiye doğumlu olduğu yabancı kökenli hasta grubunda toplam direnç oranı % 32.7 olarak daha yüksek düzeyde saptanmış ve bu hastaların bilinen yüksek dereceli primer rezistansın olduğu ülkelerden geldiği bildirilmiştir. Araştırmacılar ÇİD-TB/TİD-TB (Tek ilaca dirençli TB) oranını incelediklerinde, bu oranın 1987 yılında 1/3 iken 1993'de 1/1'e kadar yükseldiğini tesbit etmişlerdir. En dirençli ilaçlar olarak INH ve SM bulunmuştur [48]. Bu yayın son yılların artan bir sorunu kabul edilen ÇİD-TB'un önemini vurgulaması açısından dikkat çekicidir.

Diğer bir çalışmada Puerto-Rico'da 1987-1990 yılları arasında yapılan ilaç direnci araştırmalarında daha önceden tedavi almamış hastalarda %15.9, tedavi almış olgularda ise bu oranın yaklaşık iki katı ilaç direnci saptanmıştır. Çalışmaya alınan hastaların %19.7'sinde en az bir ilaca direnç gözlenmiştir. İlaç direnci INH'e %11.1, SM'ye %10, RIF'e %4.3, ancak daha önceden tedavi alanlarda ise sırasıyla %22, %18.6, %13.6 olarak saptanmıştır [49].

İmmunosüpresyon ve kronik akciğer hastalığın varlığı mikobakteriyel enfeksiyonların oluşumunda rol oynayan önemli risk faktörlerindendir. Bu hastalarda *M avium* complex, *M xenopi* gibi TDM'ler sıklıkla izole edilebilmektedir [75]. AIDS'li olgularda, lokal ve genel konak savunması kaybı olan hastaların pulmoner enfeksiyonlarında, lösemili çocuklarda ve diabetes mellitus'lu hastalarda görülen pnömonilerde *M. xenopi*'nin izole edildiği bildirilmektedir [76-80].

TDM içerisinde incelenen klinik ve radyolojik bulgularıyla tüberküloz benzeri hastalığa yol açan *M. xenopi*'nin antitüberkülo ilaç direncine ilişkin klasik bilgilerde birbiriyle çelişen ifadeler bulunmaktadır. Bir kaynakta, antitüberkülo ilaçlara ve kinolonlara duyarlı bir bakteri olduğu belirtilmişken, diğer bir kaynakta antitüberkülo ilaçlara karşı oldukça dirençli olduğu ve kombine ilaç tedavisinin uygulanması gerektiği üzerinde durulmuştur [12, 14]. Pulmoner hastalığı olan olgulardan ÇİD TB *suşlarının*

yanısıra yine ÇİD gösteren *M. xenopi* ve *M. avium* suşlarının da izole edildiği bildirilmektedir [81].

Çalışmamızda, *M. xenopi* tanısı konulan iki suştan birirsi tüm antimikrobikler için kritik konsantrasyonlara duyarlı diğeri ise INH ve RIF'in tüm konsantrasyonlarına dirençli bulunmuştur (Tablo 10).

Özellikle AIDS'li olgularda fırsatçı enfeksiyonlarda yer alan, lenf bezi biyopslerinden üretilebilen ve INH'e dirençli olduğu belirtilen bir diğer TDM olan *M. avium/intracellulare* (MAC) enfeksiyonlarının tedavisinde EM+RIF+SM kombinasyonu önerilmektedir [12]. Çalışmamızda MAC tanısı konulan suş denenen tüm antitüberkülo ilaçlara ve ofloksasine duyarlı bulunmuştur.

Değişik kliniklerden gönderilen balgam örneklerinde mikobakteriyel identifikasyon ve antitüberkülo ilaç duyarlılığını araştırdığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçları özetleyecek olursak:

1. Rutin tanı yöntemleriyle *M. tuberculosis* olduğu düşünülen 55 suşun, MIS'de yapılan gaz kromatografik analizlerinde 3 suşun (% 5.4) farklı tür (2'si *M. xenopi,* 1'i *M. avium-intracellulare*) olduğu saptanmıştır.

2. Proporsiyon yöntemi ile *M. tuberculosis* suşlarının antitüberkülo ilaçların kritik konsantrasyonlarda SM'ye % 17.3, INH'e % 3.9, EM'e % 3.9 direnç saptanmış; RIF ve OFX'e karşı kritik konsantrasyonlarda direnç saptanamamıştır.

3. Kritik konsantrasyonlarda yalnız tek ilaca dirençli toplam suş sayısı 10 ve direnç oranı da % 19.2 tesbit edilmiştir.

4. Kritik konsantrasyonda birden fazla antitüberkülo ilaca direnç (INH+SM+EM ile ilişkili olmak üzere), yalnız bir suş ile ilgili olarak tespit edilmiştir.

5. *M. tuberculosis* suşlarında düşük MIC konsantrasyonları dışında ÇİD-TB'ye rastlanmamıştır (4. maddede belirttiğimiz suşta RIF direnci bulunmaması ÇİD-TB değerlendirmesi yapılmasına olanak tanımamaktadır).

6. *M. xenopi* tanısı koyulan 2 suşun yapılan antitüberkülo ilaç duyarlılık değerlendirmesinde; birinin kritik konsantrasyonlarda sadece INH+RIF direncine sahip olduğu, diğerinin ise tüm ilaçlara duyarlı olduğu bulunmuştur.

7. MAC tanısı konulan suş ise kritik ilaç konsantrasyonlarında tüm klasik antitüberkülo ilaçlar ve ofloksasine duyarlı bulunmuştur.

Sonuç olarak, toplumun geniş bir kesiminde -özellikle ekonomik olarak üretken bir yaş grubunda- etkili olan, önemli ailesel ve sosyal sorunları da beraberinde getiren TB'la sağlıklı bir mücadele için; en başta iyi bir TB kontrol programı oluşturulmalı ve TB konusunda deneyimli personelin çalıştığı tam donanımlı mikobakteri laboratuarları kurulmalıdır. Ayrıca, TB'lu hasta yakınları taranarak toplumda oluşturacakları risklerin önlenmesi, antitüberkülo duyarlılık testlerinin çalışılması ve DOTS stratejisine uygun tedavilerin planlanması, yapılabilecek özel mikobakteriyel tanı testleri ile son yıllarda artış gösteren TDM enfeksiyonlarının atlanmaması ve en önemlisi halkımızın TB ve sonuçları hakkında bilgilendirilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Rouillon A. 24 March--International Tuberculosis Day. *Tuber Lung Dis* 1996; 77(1):1

2. Kocabaş A. Akciğer Tüberkülozu. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed). İnfeksiyon Hastalıkları (Kitabında). 1. Baskı, İstanbul: Nobel Kitabevi, 1996: 396-441

3. Kaya A, Kaya SU, Gönüllü U. Tüberkülozda tedavi. T Klin Tıp Bilimleri 1994; 14 (6): 431-438

4. Frieden TR, Lerner BH, Rutherford BR. Lessons from the 1800s: tuberculosis control in the new miiennium. Lancet 2000; 355: 1088-1092

5. Anğ Ö, Erturan Z, Uzun M. Dünyada ve Türkiye'de tüberküloz. İnfeks Derg 1997; 11(4, ek): 1-5

6. Lutfey M, Della-Latta P, Kapur V, et al. Independent origin of mono rifampin resistant *Mycobacterium* tuberculosis in patients with AIDS. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: 837-840

7. Uçan ES. Pulmoner tüberküloz tedavisi ve direnç sorunu . 9. Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon hastalıkları Kongresi. KLİMİK 99 Program ve Özet Kitabında Antalya 3-8 Ekim 1999; 112-113

8. Arévalo M, Solera J, Cebrian D, Bartolomé J, Robles P. Risk factors associated with *Mycobacterium* tuberculosis in Castilla-la-Mancha (Spain). Eur Respir J 1996; 9: 274-278

9. Rao SN, Mookerjee AL, Obasanjo OO, Chaisson RE. Errors in the treatment of tuberculosis in Baltimore. *Chest* 2000;117(3):734-737

10. Haas DW, Des Prez RM. *Mycobacterium* tuberculosis. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, (eds) Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol 2, 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:2213-2243

11. Bownds SE, Kurzynski TA, Norden MA, Dufek JL, Schell RF. Rapid susceptibility testing for nontuberculosis mycobacteria using flow cytometry. J Clin Microbiol 1996; 34: 1386-1390

12. Kıyan M. Mycobacteriaceae. Ustaçelebi Ş, (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabında. Ankara: Öncü Basımevi, 1999; 419-455

13. Binkin NJ, Vernon AA, Simone PM, McCray E, Miller BI, Schieffelbein CW, Castro KG. Tuberculosis prevention and control activities in the United States: an overview of the organization of tuberculosis services. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(8): 663-674

14. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları. 9. Baskı, İzmir: Barış Yayınları, 1996: 397-439

15. Hashimoto T. BCG vaccines for the prevention of tuberculosis in the world *Kekkaku* 1997; 72(11): 629-637

16. World Health Organization. Global Tuberculosis Programme. Global Tuberculosis Control. WHO Report 1999. WHO/TB/99.259

17. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1992: 703-755

18. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. St. Louis: Mosby 1994: 590-633

19. Gedikoğlu S. *Mycobacterium* tuberculosis'in hücre yapısı. İnfeks Derg 1997; 11(4, ek): 13-18

20. Master RN. Mycobacteriology. Isenberg HD, (ed). In: Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol 1, Washington DC: ASM 1992: 3.0.1-3.16.4

21. Kılıçturgay K. Tüberkülozda immunopatogenez. İnfeks Derg 1997; 11(4, ek):7-12

22. Karaca Ö, Rota S. Tüberküloz immünolojisi. Klimik Derg 1995; 8(2): 59-62

23. Yüce A. Tüberküloz tedavisinde yeni yaklaşımlar. 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 21-22 Nisan Ankara, 1998:104-121

24. Özkara Ş. Tüberküloz tedavisinde hasta uyumu ve çok-ilaca dirençli tüberküloz hastasına yaklaşım. Ankem Derg 1998; 12 (3): 384-390

25. Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber Lung Dis* 1999;79(4):243-250

26. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 2. Baskı, İzmir: Barış Yayınları, 1995: 567-585

27. Özdemir Ö. Tüberküloz tanısında sorunlar. 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 21-22 Nisan Ankara, 1998: 78-86

28. Unat EK. Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi. 1. Baskı, İstanbul: Dergah Tıp Yayınları, 1982: 312-388

29. Blanchard JS. Moleculer mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Annu. Rev. Biochem. 1996; 65: 215-239

30. Rota S. *Mycobacterium tuberculosis*'in antitüberkülo ilaçlara direnç mekanizmaları. İnfeks Derg 1997; 11(4, ek): 43-45

31. Soini H, Pan X, Amin A, Graviss EA, Siddiqui A, Musser JM. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston,Texas,by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2000;38(2):669-76

32. Erturan Z. Antitüberkülo ilaçlar. İnfeks Derg 1997; 11(4, ek): 35-42

33. Yüce A. Mikobakterilerde antibiyotik duyarlılık testleri. İnfeks Derg 1997; 11(4,ek): 47-51

34. Miller MA, Thibert L, Desjardins F, Sıddıqı SH, Dascal A. Growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by polyoxyethylene stearate present in the Bactec pyrazinamide susceptibility test. J Clin Microbiol 1996; 34: 84-86

35. Woods GL, Witebsky FG. Mycobacterial testing in clinical laboratories that participate in the college of American pathologists' mycobacteriology E survey: results of a 1993 questionnaire. J Clin Microbiol 1995; 33: 407-412

36. Norden MA, Kurzynski TA, Bownds SE, Callister SM, Schell RF. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) by flow cytometry. J Clin Microbiol 1995; 33: 1231-1237

37. Ellner PD, Kiehn TE, Cammarata R, Hosmer M. Rapid detection of pathogenic mycobacteria by combining radyometric and nucleic acid probe methods. J Clin Microbiol 1988; 26: 1349

38. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JD, Malinowski DP. Strand displacement amplification and isothermal in vitro DNA amplification technique .Nucleic Acids Res 1992; 20: 1961

39. Jonas V, Alden MJ, Curry JI, et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from induced sputum specimens using amplification of rRna. J Clin Microbiol 1993;31: 2410

40. Walters SB, Hanna BA. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by *Mycobacterium* growth indicator tube method. J Clin Microbiol 1996;34: 1565-1567

41. Martinez-Vazguez JM, Ocana I, Segura RM, Pascual C. Adenosine deaminase activity in the diagnosis of tuberculosis. Gut 1986; 27: 1049

42. Öztürk R. Tüberküloz tanısında yenilikler. VIII. Türk Mikrobiyoloji Ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Program ve Özet Kitabı. 06-10 Ekim 1997: 108-120

43. Smid I, Salfinger M. Mycobacterial identification by computer-aided gas-liquid chromatography. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 19(2):81-88

44. Helvacı S. Tüberküloz tedavisinde yeni yaklaşımlar. İnfeks Derg 1997; 11(4,ek): 53-56

45. Bloch AB, Cauthen GM, Onorato IM, et al. Nationwide survey of drug-resistant tüberculosis in the United States. Jama 1994; 271(9).665-671

46. Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn JO, Cauthen GM, Dooley SW. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York city. N Engl J Med 1993; 328: 521-526

47. Moore M, Onorato IM, McCray E, Castro KG. Trends in drug-resistant tuberculosis in the United States, 1993-1996. JAMA 1997;278(10): 833-837

48. Schaberg T, Gloger G, Reichert B, Mauch H, Lode H. Drug-resistant pulmonary tuberculosis in Berlin, Germany, 1987-1993. Eur Respir J 1995; 8: 278-284

49. Grandes G, Lopez-De-Munain J, Diaz T, Rullan JV. Drug resistant tuberculosis in Puerto Rico,1987-1990. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 6-9

50. Bifani PJ, Plikaytis BB, Kapur V, et al. Origin and interstate spread of a New York city multidrug-resistant *Mycobacterium* tuberculosis clone family. JAMA 1996; 275:452-457

51. Lutfey M, Della-Latta P, Kapur V, et al. Independent origin of mono rifampin resistant *Mycobacterium* tuberculosis in patients with Aids. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: 837-840

52. Scarpellini P, Braglia S, Brambilla AM, et al. Detection of rifampin resistance by single-strand conformation polymorphism analysis of

cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system. J Clin Microbiol 1997; 35: 2802-2806

53. Arseven O, Eraksoy H, Uzun Y, ve ark. Doğu Karadeniz Bölgesinde tüberküloz ilaçlarına direnç durumu. Klimik 1995; 8 (2): 63-67

54. Çalışır HC. Tüberküloz tedavisindeki sorunlar. 2. Ulusal Mikobakteri sempozyumu. 21-22 Nisan Ankara,1998: 87-94

55. Kılıçaslan Z. Kime tüberküloz tedavisi başlanmalıdır? Yeni olgularda tedavi ilkeleri. Ankem Derg 1998; 12 (3): 374-377

56. Enarson DA: The international union against and lung disease model. National Tuberculosis Programmes (editorial), Tuber Lung Dis 1995; 76: 95

57. Miyamoto J, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K. New drug susceptibility test for *Mycobacterium* tuberculosis using the hybridization protection assay. J Clin Microbiol 1996; 34: 1323-1326

58. Wanger A, Mills K. Testing of *Mycobacterium* tuberculosis susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin and streptomycin by using E test. J Clin Microbiol 1996; 34: 1672-1676

59. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol 1993; 31: 767-770

60. Yüce A, Hatipoğlu O, Uçan ES, Kırdar S, Akkoçlu A. Tüberküloz ilaçlarına karşı primer direnç. İnfeks Derg 1994; 8 (3-4):95-98

61. Karabay O, Otkun M, Akata F, Karlıkaya C, Tuğrul M, Dündar V. Trakya bölgesinde antitüberkülo ilaç direnci ve ilişkin risk faktörleri. İnfeks Derg 1999; 13(1): 43-50

62. Çoban AY, Saniç A, Eroğlu C, Günaydın M, Durupınar B.İzoniazid, rifampisin, etambutol ve streptomisin'e karşı M. tuberculosis izolatlarının in vitro duyarlılıklarının proportion metod ile araştırılması.

2. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 21-22 Nisan Ankara, 1998: 179-180

63. Aydın Ö, Özakın C, Gedikoğlu S. 175 *Mycobacterium* tuberculosis complex suşunun, BACTEC ile saptanan anti-tüberküloz ilaç duyarlılıkları. 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 21-22 Nisan Ankara, 1998: 173.

64. Emekdaş G, Kocabeyoğlu Ö, Erdemoğlu A, Ceylanlı S, Diler M. Tüberküloz basillerinin major antibiyotiklere duyarlılığı. 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 21-22 Nisan Ankara, 1998: 177-178

65. Yorgancıoğlu A, Aktoğu S, Çırak K, Uçan ES, Köse T, Florat N. Akciğer tüberkülozunda ilaç direnci. Solunum 1995; 20: 203-211

66. Bakıcı MZ, Bakır M, Yalçın AN. *Mycobacterium* tuberculosis suşlarının anti tüberküloid ilaçlara direnç durumları. İnfeks Derg, 1993; 7(1-2): 91-93

67. Özcan M, Özbal Y, Fazlı ŞA, Kılıç H. Kayseri'de Tüberküloz kompleksi mikobakterilerin antitüberkülotiklere karşı direnç durumu. 2.Ulusal Mikobakteri Sempozyumu 21-22 Nisan Ankara, 1998:175

68. Balcı İ, Bayram A, Filiz A. *Mycobacterium tuberculosis*'de birinci seçenek ilaçlara direnç. İnfeks Derg, 1999; 13(4): 521-525

69. Çildağ O, Aktaş O, Mirici A, Başdaş Ü, Özbek Ü. In vitro susceptibilities of *Mycobacterium* tuberculosis strains to classical anti-tuberculous agents, some quinolones and amikacin.Tr J Med Sci 1994; 21(2): 117-121

70. Neville K, Bromberg A, Bromberg R, Bonk S, Hanna BA, Rom WN. The third epidemic multidrug-resistant tuberculosis. Chest 1994; 105: 45-48

71. Yew WW, Chau CH. Drug-resistant tuberculosis in the 1990s. Eur Respir J 1995; 8: 1184-1192

72. Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: commentary on a re-emergent killer. Science 1992; 257: 1055-1064

73. Rota S. *Mycobacterium* tuberculosis'in ilaçlara gösterdiği dirençte rol oynayan moleküler mekanizmalar. 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu 21-22 Nisan Ankara,1998:26-34

74. Cambau E, Sougakoff W, Besson M,et al. Selection of gyr A mutant *Mycobacterium* tuberculosis resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. J Infect Dis 1994; 170: 479-483

75. Kesten S, Chaparro C. Mycobacterial infections in lung transplant recipients. *Chest* 1999;115(3):741-745

76. Stauffer F, Bankier AA, Strasser G, Kreuzer S, Lahounik E, Rieger A. Mycobacteria other than tuberculosis with an emphasis on *Mycobacterium* xenopi in clinical specimens from AIDS patients at the University Hospital of Vienna from 1989 to 1996. *Wien Klin Wochenschr* 1999; 29;111(2):56-58

77. Levendoglu-Tugal O, Munoz J, Brudnicki A, Fevzi Ozkaynak M, Sandoval C, Jayabose S. Infections due to nontuberculous mycobacteria in children with leukemia. *Clin Infect Dis* 1998; 27(5):1227-1230

78. Juffermans NP, Verbon A, Danner SA, Kuijper EJ, Speelman P. *Mycobacterium* xenopi in HIV-infected patients: an emerging pathogen. *AIDS* 1998; 12(13):1661-1666

79. el-Helou P, Rachlis A, Fong I, Walmsley S, Phillips A, Salit I, Simor AE. *Mycobacterium* xenopi infection in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1997;25(2): 206-210

80. Damsker B, Bottone EJ, Deligdisch L. *Mycobacterium* xenopi: infection in an immunocompromised host. *Hum Pathol* 1982; 13(9):866-870

81. Jouveshomme S, Dautzenberg B, Bakdach H, Derenne JP. Preliminary results of collapse therapy with plombage for pulmonary disease caused by multidrug-resistant mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(5 Pt 1):1609-1615

EK. Mikobakterilerin ayırt edilmesini sağlayan özellikleri[17]

Tür	Üreme ısısı	Üreme zamanı	Pigmentasyon		Niasin Testi	NO3 Red.	Tween 80 hidrolizi	katalaz		Aryl sülfataz	Üreaz	PZAaz	Demir Uptake	Değişik ortamlara üreme		
			Işıkta	Karanlıkta				Yarı Kantitatif	68 °C ve PH:7'de					T2H'da (1µg/ml)	% 5 NaCl'de 28 °C'de	MacConkey agarda
M. tuberculosis	37 °C	12-25 gün	Soluk sarı	Soluk sarı	+	+	D	< 45	-	-	+	+	-	+	-	-
M. africanum	37 °C	31-42 gün	Soluk sarı	Soluk sarı	D	D	-	> 45	-	-						
M. bovis	37 C	24-40 gün	Soluk sarı	Soluk sarı	D	-	-	< 45	-	-	+	-	-	-	-	-
M. ulcerans	32 °C	28-60 gün	Soluk sarı	Soluk sarı			-	> 45	+	-		-				
M. kansasiii	37 °C	10-20 gün	Sarı	Soluk sarı	-	+	+	> 45	+	-	+	-	-	+	-	-
M. marinum	30 °C	5-14 gün	Sarı	Soluk sarı	D	-	+	> 45	-	D	+	+	-	+	-	-
M. simiae	37 °C	7-14 gün	Sarı	Soluk sarı	+	-	-	> 45	+	-	+	-	-	+	-	
M. asiaticum	37 °C	10-21 gün	Sarı	Soluk sarı	-	-	+	> 45	+	-	-	-	-	+	-	
M. szulgai	37 °C	12-25 gün	Sarı-portakal	Sarı-soluk sarı	-	+	D	> 45	+	-	+	-	-	+	-	-
M. scrofulaceum	37 °C	10 gün +	Sarı	Sarı	-	-	-	> 45	+	-	+	D	-	+	-	-
M. gordonae	37 °C	10 gün +	Sarı-portakal	Sarı	-	-	+	> 45	+	-	-	D	-	+	-	-
M. thermoresistible	45 °C	7 gün	Sarı	Sarı	-	+	+	> 45	+	-	+		-		+	-
M. flavescens	37 °C	7-10 gün	Sarı	Sarı	-	+	+	> 45	+	-	+	+	-	+	D	-
M. xenopi	42 °C	14-28 gün	Sarı	Sarı	-	-	-		+	+	-	+	-	+	-	-
M. avium complex	37 °C	10-21 gün	Soluk-açık sarı	Soluk - açık sarı	-	-	-	< 45	-	-	-	+	-	+	-	D
M. haemophilum	30 °C	14-21 gün	Gri	Gri	-	-	-	< 45	-	-	-	+	-	+	-	
M. malmoense	37 °C	21-28 gün	Soluk sarı	Soluk sarı	-	-	+	< 45	D	-	D	D	-	+	-	
M. gastri	37 °C	10-21 gün	Soluk sarı	Soluk sarı	-	-	+	< 45	-	-	+	-	-	+	-	-
M. terrae complex	37 °C	10-21 gün	Soluk sarı	Soluk sarı	-	D	+	> 45	+	+	-	D	-	+	-	D
M. triviale	37 °C	10-21 gün	Soluk sarı	Soluk sarı	-	+	+	> 45	+	D	-	D	-	+	+	
M. fortiutum	37 °C	3-5 gün	Soluk sarı	Soluk sarı	-	+	D	> 45	+	+	+	+	+	+	+	+
M. chelonei					-											
Spp chelonei	28 °C	3-5 gün	Soluk sarı	Soluk sarı	D	-	D	> 45	+	+	+	+	-	+	-	-
Spp abscessus	35 °C	3-5 gün	Soluk sarı	Soluk sarı	-	-	D	> 45	+	+	+	+	-	+	+	+
M. smegmatis	37 °C	3-5 gün	Soluk sarı-sarı	Soluk sarı-sarı	-	+	+	> 45	+	-			+	+	-	

D: değişken, - : olumsuz, +: olumlu

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ