

FEEDENİZ SERTEL ŞELALE

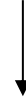
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

2015

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**TÜBERKÜLOZ TANISINDA VE ÇOK İLACA DİRENCİN
(MDR) BELİRLENMESİNDE MICROSCOPIC-
OBSERVATION DRUG SUSCEPTIBILITY (MODS)
YÖNTEMİNİN DEĞERİ**

DENİZ SERTEL ŞELELE

**DANIŞMAN
PROF. DR. MELTEM UZUN**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Programında Deniz Sertel Şelale tarafından hazırlanan Tüberküloz tanısında ve çok ilaca direncin (MDR) belirlenmesinde microscopic-observation drug susceptibility (MODS) yönteminin değeri başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

/ /

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
---	---------------

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Deniz Sertel Şelale

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali Ağaçfıdan'a ilgi ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Her konuda ilgi ve desteğini gördüğüm, yakınlığı ve içtenliği ile her zaman yanımda olan, eşsiz bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, öğrencisi olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum çok değerli danışmanım Prof. Dr. Meltem Uzun'a rehberliği, öğrettikleri, emeği ve sabrı için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her daim ilgi ve desteğini gördüğüm, vizyonu ile bana örnek olan Prof. Dr. Mine Anğ Küçükler'e minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Değerli yardımlarından dolayı Prof. Dr. Zayre Erturan, Uzm. Dr. Derya Cenger, Prof. Dr. Ahmet Dirican, Doç. Dr. Dilek Şatana ve Dr. Gonca Erköse Genç'e teşekkürü borç bilirim.

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Selim Badur, Prof. Dr. Bülent Gürler, Prof. Dr. Şengül Derbentli, Prof. Dr. Nezahat Gürler, Prof. Dr. Yıldız Yeğenoğlu, Prof. Dr. O. Şadi Yenen, Prof. Dr. Z.Çiğdem Kayacan, Prof. Dr. Betigül Öngen, Prof. Dr. M. Derya Aydın, Prof. Dr. Y. Ali Öner, Prof. Dr. Arif Kaygusuz, Prof. Dr. Özden Büyükbaba Boral, Prof. Dr. Zerrin Aktaş, Doç. Dr. Hasan Nazik ve Doç. Dr. Yaşar Nakipoğlu'na teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm yüksek lisans, doktora ve uzmanlık öğrencilerine ilgi ve dostlukları için, ayrıca Biyolog Gülcan Assaf, Bilim Uzmanı Merve Tolunoğlu, Biyolog Serkan Asar, laborant Sercan Arslan, laborant Zeynep Demir ve laborant Mukaddes Ünsal'a tüm yardımları için teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, ilgi ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda beni destekleyen sevgili annem Bilge Aydın'a, hayatımı paylaşmaktan gurur ve mutluluk duyduğum her konuda ilgi ve desteğini gördüğüm eşim Serkan Şelale'ye en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31970

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri.....	4
2.2. Tüberküloz	5
2.2.1. Epidemiyoloji.....	10
2.2.2. Laboratuvar Tanısı	13
2.2.2.1. Örneklerin toplanması ve işlenmesi:	13
2.2.2.2. Aside dirençli boyama.....	17
2.2.2.3. Kültür	17
2.2.2.4. İdentifikasyon.....	20
2.2.3. Antimikobakteriyel ilaçlar ve duyarlılık deneyleri	26
2.2.3.1. Antimikobakteriyel ilaçlar	27
2.2.3.2. Birinci seçenek antimikobakteriyel ilaçlar	27
2.2.4. Duyarlılık deneyleri	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Malzeme ve Cihaz listesi	41
3.1.1. Cihazlar	41
3.1.2. Malzemeler.....	41
3.2. Örneklerin kabulü ve işlenmesi	43
3.3. Aside dirençli boyama	44

3.4. Kültür	44
3.5. İdentifikasyon	45
3.6. MGIT 960 sistemi ile duyarlılık deneyi.....	46
3.7. MODS yöntemi	48
3.8. Sonuçların elde edilme sürelerinin belirlenmesi	54
3.9. İstatistiksel analiz.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. Kültür sonuçları	56
4.2. Duyarlılık sonuçları	66
4.3. Sonuçların elde edilme süresi	71
5. TARTIŞMA	72
KAYNAKLAR	93
ETİK KURUL KARARI	101
ÖZGEÇMİŞ	104

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Primer ve post primer tüberkülozun temel farklılıkları.....	7
Tablo 2-2. Klinik örneklerden mikobakterilerin izolasyonu için kullanılan besiyerleri.	18
Tablo 2-3. Mikobakterilerin izolasyonunda sık kullanılan sıvı besiyeri içeren sistemler.	19
Tablo 2-4. Klinik örneklerden izole edilen ve kültürde üretilen mikobakteri türlerinin ayırt edici özellikleri	22
Tablo 3-1. Mikroskopik incelemede görülen ARB'lerin kantitatif olarak değerlendirilmesi.	44
Tablo 3-2. MODS yönteminde kültür sonuçlarının değerlendirilmesi	53
Tablo 3-3. MODS yönteminde duyarlılık deneyi sonuçlarının değerlendirilmesi.	54
Tablo 4-1. ARB pozitif ve negatif örneklerde kültür sonuçlarının dağılımı	56
Tablo 4-2. ARB pozitif ve negatif örneklerden izole edilen mikobakterilerin dağılımı.	62
Tablo 4-3. ARB pozitif balgam örneklerinde MGIT kültürü sonuçları.....	62
Tablo 4-4. ARB negatif balgam örneklerinde MGIT kültürü sonuçları	62
Tablo 4-5. Tüm balgam örneklerinde MGIT kültürü sonuçları.....	62
Tablo 4-6. ARB pozitif balgam örneklerinde LJ kültürü sonuçları	63
Tablo 4-7. ARB negatif balgam örneklerinde LJ kültürü sonuçları	63
Tablo 4-8. Tüm balgam örneklerinde LJ kültürü sonuçları	63
Tablo 4-9. ARB pozitif balgam örneklerinde MODS kültürü sonuçları	64
Tablo 4-10. ARB negatif balgam örneklerinde MODS kültürü sonuçları.....	64
Tablo 4-11. Tüm balgam örneklerinde MODS kültürü sonuçları	64
Tablo 4-12. Balgam örneklerinden MTBC'nin izole edilmesinde MODS yönteminin değeri	65
Tablo 4-13. ARB pozitif ve ARB negatif balgam örneklerinde MODS yönteminin değeri	66
Tablo 4-14. MGIT ve MODS yöntemiyle izole edilen MTBC suşlarının duyarlılık sonuçları.....	66
Tablo 4-15 . INH'a duyarlılığın belirlenmesinde MGIT ve MODS yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.....	67

Tablo 4-16. RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde MGIT ve MODS yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.....	67
Tablo 4-17. ÇİD suşlarının belirlenmesinde MGIT ve MODS yöntemlerine ait sonuçların karşılaştırılması	68
Tablo 4-18. İNH'a ve RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde ve ÇİD suşlarının tanımlanmasında MODS yönteminin değeri	69
Tablo 4-19. İNH'a ve RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde ve ÇİD suşlarının tanımlanmasında ARB pozitif örnekler için MODS yönteminin değeri	70
Tablo 5-1. TB tanısında MODS kültürünü standart kültür yöntemleriyle karşılaştıran çalışmalara ait veriler.....	77
Tablo 5-2. TB tanısında MODS kültürünü ARB negatif örnekler için değerlendiren çalışmalara ait veriler.....	79
Tablo 5-3. TB tanısında MODS kültürünü ARB pozitif örnekler için değerlendiren çalışmalara ait veriler.....	81
Tablo 5-4. İNH'a ve RİF'e direncin belirlenmesinde ve ÇİD-TB tanısında MODS yönteminin değerini gösteren çalışma verileri.....	86
Tablo 5-5. ARB pozitif örneklerde İNH'a ve RİF'e direncin belirlenmesinde ve ÇİD-TB tanısında MODS yönteminin değerini gösteren çalışma verileri.....	88
Tablo 5-6.MODS ve referans kültür yöntemlerinde kültür pozitifliği süresinin karşılaştırıldığı çalışmalara ait veriler.....	90
Tablo 5-7.MODS ve referans indirekt duyarlılık deneylerinde sonuçların elde edilme sürelerini karşılaştıran çalışma verileri.*	92

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. DSÖ'nün verilerine göre Türkiye'de TB mortalitesi ve prevalansı	12
Şekil 3-1. Antibiyotik çalışma solüsyonlarının hazırlanması	50
Şekil 3-2. Son örnek süspansiyonlarının hazırlanması	51
Şekil 3-3. Plaklardaki kuyucukların içeriği.	52
Şekil 4-1. İki farklı örnekten yapılan (her bir resim ayrı bir örnek) MODS kültürünün yedinci gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme). 57	
Şekil 4-2. MODS kültürünün sekizinci gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).	58
Şekil 4-3. MODS kültürünün dokuzuncu gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).	58
Şekil 4-4. MODS kültürünün 10. gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).	59
Şekil 4-5. MODS kültürünün 11. gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).	59
Şekil 4-6. Üç farklı örnekten yapılan (her bir resim ayrı bir örnek)MODS kültürünün 14. gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).	60
Şekil 4-7. MODS kültürünün 21. gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).	61

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

7H9: Middlebrook 7H9 buyyonu

7H10: Middlebrook 7H10 besiyeri

7H11: Middlebrook 7H11 besiyeri

ACP: Açıl taşıyıcı protein (acyl carrier protein)

AIDS: Edinilmiş immün yetmezlik sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome)

ARB: Aside dirençli (rezistan) bakteri

Bkz: Bakınız

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CFU: Koloni oluşturan birim (colony forming unit)

CLSI: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute)

CRI: Kolorimetrik redoks indikatörü (Colorimetric Redox Indicator)

ÇİD: Çok ilaca dirençli

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EZN: Ehrlich Ziehl-Neelsen

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus)

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografi (High Performance Liquid Chromatography)

IFN γ : İnterferon gamma

GA: Güven aralığı

Gİ: Güvenilirlik indeksi

GLC: Gaz-sıvı kromatografi (Gas-Liquid Chromatography)

KK: Kritik konsantrasyon

LJ: Löwenstein Jensen

MABA: Mikro kuyucuk alamar mavisi

MAC: *Mycobacterium avium* kompleksi

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu

MGIT: Mikobakteri üreme indikatör tüpleri (Mycobacteria Growth Indicator Tube)

MODS: İlaç duyarlılığının mikroskopik gözlemi (Microscopic Observation-Drug Susceptibility)

MTBC: *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolyum bromür ve

N: Nonkromojenik

NaCl: Sodyum klorür

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NALC: N-asetil-L-sistein

NaOH: Sodyum hidroksit

ND: Belirlenemedi (Not determined)

NPV: Negatif tahmin ettirici değer (Negative Predictive Value)

NRA: Nitrat redüktaz deneyi (Nitrate Reductase Assay)

P: Fotokromojenik

PAS: Paraaminosalisilik asit

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PNB: P-nitrobenzoik asit

PPV: Pozitif tahmin ettirici değer (Positive Predictive Value)

R: Pürüzlü (koloni morfolojisi)

Rf: Pürüzlü ve filamentöz uzantıları olan (koloni morfolojisi)

RNA: Ribonükleik asit

rRNA: Ribozomal RNA

Rt: Pürüzlü ve ince veya transparan (koloni morfolojisi)

S: Skotokromojenik

Sf: Düz ve filamentöz uzantıları olan (koloni morfolojisi)

SK: Semikantitatif

Sm: Düz (koloni morfolojisi)

Smt: Düz ve transparan (koloni morfolojisi)

SR: Orta pürüzlü (koloni morfolojisi)

T2H: Tiyofen-2-karboksilik asid hidrazid

TB: Tüberküloz

TDM: Tüberküloz dışı mikobakteri

TLA: İnce tabaka agar (Thin Layer Agar)

XTT: 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum

V: Değişken (variable)

YİD: Yaygın ilaç dirençli

ÖZET

Sertel Şelale Deniz. Tüberküloz tanısında ve çok ilaca direncin (MDR) belirlenmesinde microscopic-observation drug susceptibility (MODS) yönteminin değeri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul. 2015

Tüberkülozun kontrol altına alınabilmesi için *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBC) varlığının ve ilaçlara duyarlılığının belirlenmesinde ucuz, hızlı ve güvenilir testlerin varlığı çok önemlidir.

Çalışmada MODS yönteminin direkt tanı ve duyarlılık açısından performansının belirlenmesi için bu yöntem konvansiyonel kültür yöntemleri (Löwenstein-Jensen [LJ] kültürü, MGIT 960 sistemi [Mikobakteri üreme indikatör tüpleri: *Mycobacteria* Growth Indicator Tube]) ve standart duyarlılık yöntemi (MGIT sistemi) ile karşılaştırılmıştır.

İncelenen 331 balgam örneğinden 71'inde (%21,45) MODS yöntemiyle MTBC varlığı saptanmıştır. MODS yönteminin MTBC suşlarının saptanmasında duyarlılığı ve özgüllüğü (%95 güven aralığı [GA]) sırasıyla %95,95 (%91,5-100) ve 98,83 (%97,5-100) olarak bulunmuş; preparatı aside dirençli bakteri (ARB) açısından pozitif olan örneklerde duyarlılığının arttığı (%98,55 [%95,7-100]) belirlenmiştir. İsoniazide direncin belirlenmesinde MODS yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü (%95 GA) sırasıyla %87,10 (%75,3-98,9) ve %100 (% 100-100), rifampisine direncin belirlenmesinde sırasıyla %85,71 (%67,4-100) ve %96,49 (%91,7-100) ve çok ilaca dirençli suşların belirlenmesinde sırasıyla %92,31 (%77,8-100) ve %96,55 (%91,9-100) olarak bulunmuştur. Medyan kültür pozitifliği süresi MGIT sistemi (8 gün) ve MODS yöntemi ile (8 gün) benzer bulunmuşken, LJ kültürünün pozitifleşmesi anlamlı ölçüde daha uzun (20 gün) sürmüştür (her iki karşılaştırma için $p=0,000$). MODS yöntemiyle duyarlılık sonuçları MGIT sistemine kıyasla anlamlı ölçüde daha kısa sürede alınmıştır (sırasıyla medyan 8 gün, 20 gün, $p=0,000$).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar MODS yönteminin tüberkülozun direkt tanısında ve suşların isoniazide ve rifampisine duyarlılıklarının belirlenmesinde yüksek performansa sahip hızlı ve ucuz bir yöntem olduğunu ve kaynakları kısıtlı olan merkezler başta olmak üzere laboratuvarlarda rutin olarak uygulanabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler : *M. tuberculosis*, çok ilaca dirençli tüberküloz, ilaç direnci, isoniazid, rifampisin

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31970

ABSTRACT

Sertel Şelale Deniz. The value of microscopic-observation drug susceptibility (MODS) assay in the diagnosis of tuberculosis and detection of multidrug resistance (MDR). İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Microbiology. İstanbul. 2015.

In control of tuberculosis, inexpensive, rapid, and reliable tests, detecting the presence of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and its drug susceptibility, are crucial.

In this study the performance of the MODS assay in direct detection of MTBC and its susceptibility to drugs was compared with conventional culture methods (Löwenstein-Jensen [LJ] culture, Mycobacterial Growth Indicator Tube 960 [MGIT] system) and standart drug susceptibility testing (MGIT system).

Of the 331 sputum samples 71 (%21.45) yielded culture positive for MTBC by MODS assay. Sensitivity and specificity (% 95 confidence interval) of MODS assay for detection of MTBC strains were %95.95 (%91.5-100) and 98.83 (%97.5-100) respectively; the sensitivity of the assay was higher (%98.55 [%95.7-100]) in smear positive specimens. MODS assay detected isoniazid, rifampicin and multi-drug resistant isolates with %87.10 (%75.3-98.9), %85.71 (%67.4-100) and %92.31 (%77.8-100) sensitivity and %100 (%100-100), %96.49 (%91.7-100) and %96.55 (%91.9-100) specifity, respectively. Median time for culture positivity was similar for MGIT system (8 days) and MODS assay (8 days) but was significantly longer with LJ culture (20 days) (p=0.000 for both comparisons). Median time to the availability of the susceptibility results was significantly shorter with MODS assay (8 days) compared to MGIT system (20 days) (p=0.000).

The findings of this study indicates that MODS assay is an inexpensive and rapid test with good performance characteristics for direct diagnosis of tuberculosis and detection of isoniazid and rifampicin resistance and can be applied routinely particularly in resource limited settings.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, mutlti-drug resistant tuberculosis, drug resistance, isoniazid, rifampicin.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 31970

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm dünyada bilinen en eski hastalıklardan biri tüberkülozdur. On sekizinci yüzyılın sonları ve 19. yüzyılda nüfusun artması ve şehirleşmenin başlamasıyla epidemilere yol açmıştır. Hastalığın etkeni ve bulaş yollarının bulunması ve etkili ilaçların geliştirilmesiyle tüberküloz gelişmiş ülkelerde büyük ölçüde kontrol altına alınabilmiş olsa da birçok gelişmekte olan ülkede mortalite ve morbidite 19. yüzyıl seviyelerinde kalmıştır. Edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome) pandemisi ve çok ilaca dirençli (ÇİD) *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının yayılması küresel tüberküloz (TB) yükünü arttırmıştır. Küresel olarak dünya nüfusunun üçte biri infektidir ve 30 milyon kişi aktif TB hastasıdır. TB dünyadaki en ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biridir ve majör küresel halk sağlığı problemi olarak tanımlanmaktadır, bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) TB'nin olmadığı bir dünya vizyonu ile TB'yi durdurma stratejisi (Stop TB strategy) oluşturmuştur [1,2,3,4].

Son 20 yılda TB vakalarının azaltılmasında önemli ilerleme kaydedilmiştir. Tüm dünyada TB insidansında 2000-2013 yılları arasında ortalama olarak her sene yaklaşık %1,5 oranında azalma gözlenmiştir. TB prevalansı ve mortalitesi 1990 ve 2013 yılları arasında sırasıyla %41 ve %45 oranında azalmıştır. Bu ümitlendirici gelişmeye rağmen küresel TB yükü hala çok yüksektir ve 2015 yılına kadar hedeflenen %50'lik azalmanın sağlanabilmesi için ilermenin hızlanması gerekmektedir. DSÖ "Küresel Tüberküloz 2014 Raporu"na göre 2013 yılında 9 milyon kişide TB geliştiği, 1,5 milyon kişinin TB nedeni ile hayatını kaybettiği ve TB nedenli ölümlerin 360.000'inin insan immün yetmezlik virüsü (HIV: Human Immunodeficiency Virus) ile infekte kişilerde görüldüğü tahmin edilmektedir. DSÖ'ye 2013 yılında, 5,7 milyonu yeni vaka ve 0,4 milyonu tedavi görmekte olan vaka olmak üzere toplam 6,1 milyon TB vakası bildirilmiştir. Bu da, 2013 yılında geliştiği tahmin edilen 9 milyon TB vakasının yaklaşık % 64'ünün saptanabildiğini ve sonuç olarak, tanı konulamayan ya da tanı konulmuş olsa da ulusal TB programlarına bildirilmeyen yaklaşık 3 milyon vaka olduğunu göstermektedir [5].

Altı DSÖ bölgesinin ikisinde (Amerika ve Batı Pasifik bölgeleri) TB hastalık yükünde (insidans, prevalans ve mortalitede) azalma açısından 2015 yılı hedeflerine

ulaşılmıştır. Güney Doğu Asya bölgesinde kaydedilen ilerlemenin 2015 yılına kadar belirlenen hedeflere ulaşılabilmesini sağlayacak düzeyde olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, insidans, prevalans ve mortalitede azalma olsa da Afrika, Doğu Akdeniz ve Avrupa bölgelerinde belirlenen hedeflere 2015 yılına kadar ulaşılabilmesi için yeterli hızda ilerleme kaydedilemediği belirtilmiştir [5].

İnsidans ve mortalitenin azalmasına rağmen, ÇİD-TB (en az isoniazid [İNH] ve rifampisine [RİF'e] dirençli suşların neden olduğu TB) ve yaygın ilaç dirençli (YİD)-TB (İNH, RİF ve en az bir florokinolona ve bir enjektabl ilaca dirençli olan suşların neden olduğu TB), bu hastalığın kontrolü ve tedavisinde büyük bir sorun oluşturmaktadır. Küresel olarak 2013 yılında 480.000 kişide ÇİD-TB görüldüğü ve 210.000 kişinin ÇİD-TB nedeniyle hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir [5].

İlaç duyarlılık deneyleri yeterli oranda yapılamadığından 2013 yılında küresel olarak ÇİD-TB vakalarının %45'inin tespit edilebildiği, hastalık yükü yüksek olan ülkelerin çoğunda ise bu oranın %30'un altında kaldığı belirtilmiştir. Mevcut durumda, küresel olarak bildirilen yeni vakaların %3,5'inin ve önceden tedavi almış olan vakaların %20,5'inin ÇİD-TB olduğu bildirilmiştir. Tüm dünyada 2013 yılında hemen hemen 97.000 hastaya ÇİD-TB tedavisi başlandığı belirtilmiştir. Küresel olarak ÇİD-TB tedavisi alan hastaların sadece %48'inde tedavi başarılı olmuştur [5].

Hali hazırda bugüne kadar 100 ülkede YİD-TB tespit edilmiştir. Tüm dünyada ÇİD-TB'li hastaların yaklaşık %9'unun YİD-TB olduğu tahmin edilmektedir. Kırk ülkeden bildirilen 1269 YİD-TB hastasının (2011 kohortu) sadece 284'ünde (%22) tedavi başarıyla tamamlanmıştır, 438 hasta (%35) ise hayatını kaybetmiştir. Küresel olarak tanı ve tedavideki yetersizlikler, TB yükü yüksek olan çoğu ülkedeki sosyal ve ekonomik istikrarsızlık ve ilaç direnci olan suşların yayılımının artması ilaç dirençli TB'yi 21. yüzyılın en önemli sağlık sorunlarından biri yapmaktadır. Tanı ve duyarlılık deneylerinin hızlı ve doğru olarak yapılması ve sonrasında uygun tedavinin başlatılması TB kontrolü başarısındaki en önemli adımdır [5,6].

DSÖ tarafından ÇİD-TB'nin hızlı tanısında ticari sıvı kültür sistemleri ve moleküler line prob deneyleri altın standart olarak kabul edilmişlerdir. Bununla birlikte, teknik zorluk, maliyet ve gelişmiş laboratuvar altyapılarına gerek duymaları nedeniyle kaynakları kısıtlı olan merkezlerde bu teknolojilerin kullanımı sınırlıdır [7].

Son yıllarda birçok ticari olmayan kültür ve ilaç duyarlılık yöntemleri geliştirilmiş ve gelişmiş labortuvar alt yapılarına ve teknik uzmanlığa sahip olmayan merkezlerde kullanımları amaçlanmıştır. Birkaç yöntem hızlı ve pahalı olmayan yöntemler olarak başta umut vaat etmiştir. Bunlardan en gelişmiş olanları MODS, kolorimetrik redoks indikatörü (CRI) yöntemleri, ince tabaka agar (TLA) yöntemleri, nitrat redüktaz deneyi (NRA) ve mikobakteriyofaj temelli deneylerdir. Bu yöntemler 2009 yılında DSÖ tarafından değerlendirilmiş ve yapılan bu değerlendirmede CRI yöntemleri, MODS ve NRA 'nın kullanımını destekleyen yeterli kanıt olduğuna kanaat getirilmiştir [7].

MODS yöntemi ucuz ve yaygın olarak bulunan laboratuvar ekipmanları ile gerçekleştirilebilecek hızlı bir yöntemdir. Bu yöntemde ilaç içeren ve içermeyen sıvı besiyerine hastalardan alınan örnekler direkt olarak inoküle edilmekte ve kültürler erken üreme veya mikrokoloni oluşumu yönünden mikroskopta incelenmektedir. *M. tuberculosis* suşlarının sadece ilaçsız besiyerinde üremesi pozitif kültürü ifade ederken, hem ilaçsız hem de ilaçlı besiyerinde üremesi ilaca direnci göstermekte ve kültür ile duyarlılık sonuçları aynı anda alınabilmektedir. MODS yöntemini inceleyen ve konvansiyonel yöntemlerle karşılaştıran çeşitli çalışmalarda MODS'un klinik örneklerde *M. tuberculosis* varlığının ve ilaç duyarlılığının saptanmasında konvansiyonel yöntemlere ucuz, ve hızlı bir alternatif olduğu belirtilmiştir [8-12].

Ülkemizde MODS yöntemini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmada TB şüpheli hastalara ait balgam örnekleri hem konvansiyonel yöntemler (MGIT 960 sistemi ve LJ kültürü) hem de MODS yöntemiyle incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırılarak, MODS yönteminin kültür ve ÇİD-TB tanısındaki değeri ve rutin olarak uygulanabilirliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Actinomyces sınıfı, *Actinomycetales* takımı, *Mycobacteriaceae* ailesinde yer alan tek cins olan *Mycobacterium* cinsine dahil olan mikroorganizmalar çok ince (0,2-0,4 x 2-10 µm), hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz çomaklardır. Mikobakterilerin hücre duvarı, diğer bakterilerden farklı olarak N-asetilmuramik asit yerine N-glikolmuramik asit içerir ve %60 oranında mikolik asit olarak adlandırılan uzun zincirli, β hidroksillenmiş tek bir sınıf yağ içerir. Çeşitli polisakkarit ve peptidler içeren bu kompleks, hücre yüzeyinde balmumu özelliğinde bir yapı oluşturur ve bu yapı mikobakterilerin güçlü hidrofobik özellik göstermesine neden olur. Bu hücre duvarı yapısı nedeniyle mikobakteriler yaygın olarak kullanılan bazik anilin boyalar (Gram boyama yönteminde kullanılanlar gibi) ile zor boyanırlar. Bununla birlikte özel yöntemler ile boyandıklarında asit ve alkol kullanılsa bile kolay dekolorize edilemezler. Hücre duvarı yapısına bağlı bu önemli özelliklerinden dolayı mikobakteriler “asit ve alkole dirençli” olarak adlandırılırlar. Bu özellikleri sayesinde mikobakterileri diğer cinslerden ayırt etmek mümkündür [1,2,13,14].

Hücre duvarı birçok kimyasal dezenfektanın geçişini engelleyerek mikobakterileri, kuvvetli asit ve bazların aşındırıcı etkisine karşı dirençli kılar. Mikobakteriler haricindeki diğer mikroorganizmalar bu bileşiklerle muamele edildiğinde zarar görürken, mikobakteriler bu bileşiklere dirençli olma özelliği sayesinde balgam gibi klinik örneklerin dekontaminasyonu sırasında daha az zarara uğrar. Mikobakteriler aynı zamanda kuruluğa da oldukça dirençlidirler ancak, sıcaklık ve ultraviyole ışınlarına duyarlıdırlar. Hidrofobik hücre yüzeyleri küme yaparak üremelerine ve besin maddelerinin hücre içine yavaş alınmasına neden olduğundan, birçok mikobakteri türü 8 ila 24 saatte bir bölünerek yavaş ürerler. Türler, üreme hızı, optimal üreme sıcaklığı, pigment oluşturma ve diğer biyokimyasal testlerle birbirinden ayrılır. Günümüzde hayvan deneyleri nadiren kullanılmakla birlikte, *in vitro* olarak üretilemediğinden bu yöntem *Mycobacterium leprae* için uygundur [1,13-15].

Moleküler teknikler sayesinde günümüzde 200’e yakın mikobakteri türü tanımlanmıştır. Çoğunluğu çevresel saprofitler olsa da bazıları insan ve hayvanlarda fırsatçı infeksiyonlar oluşturabilir. Bununla birlikte, insanlarda mikobakterilerin neden

olduğu, zorunlu patojenlerce oluşturulan iki hastalık bulunur: TB ve lepra. TB hastalığına MTBC üyeleri neden olur, lepra hastalığında ise etken *Mycobacterium leprae* 'dir [2,14].

2.2. Tüberküloz

TB solunum yoluyla bulaşan bir hastalıktır ve infeksiyon etken organizmayı taşıyan damlacık çekirdeklerinin inhalasyonu ile gerçekleşir. Bunun yanı sıra insanlar, TB'li ineklerin sütünü tükettikten sonra gastrointestinal yolla (pastörizasyon işlemi nedeniyle günümüzde yaygın değildir) veya nadiren, bütünlüğü bozulmuş deri yoluyla da infekte olabilirler. Tek bir öksürük ile 3000 kadar infekte damlacık oluşabilmekte ve duyarlı bireylerde 10'dan az sayıda mikroorganizma pulmoner infeksiyon oluşturabilmektedir. Bu nedenle infeksiyon kapma olasılığı hastalıklı kişinin balgamında bulunan mikroorganizma sayısı, öksürük sıklığı ve verimliliği, temasın yakınlığı ve temas alanının yeterli oranda havalandırılıp havalandırılmasına bağlıdır. Epidemiyolojik veriler, genellikle insanlarda infeksiyon oluşması için düşük dozlardan ziyade yüksek dozlar veya uzun süreli maruziyet gerektiğini göstermiştir [15].

Primer tüberküloz:

M. tuberculosis intraselüler bir patojendir ve infeksiyon oluşturmadaki başarısı fagositlerin öldürme mekanizmalarından kaçma yeteneğine bağlıdır. Primer TB, TB etkeni bakteriyi içeren damlacığın inhalasyonunun ardından periferik solunum yolu alveollerine (çoğunlukla orta ve alt loblar) dağıldığı ilk infeksiyondur. Etken bakteriler burada alveolar makrofajlarca tanınır ve fagosite edilirler. Böylelikle makrofajlar ile, günler içinde çözümlenebilecek veya yıllarca sürebilecek, iki cepheli bir savaş başlamış olur. İlk cephe makrofajın sindirim mekanizmalarıdır. *M. tuberculosis* fagozomun asidifikasyonunu engelleme yeteneğine sahiptir, bu da asidik pH gereksinimi duyan lizozom enzimlerinin etkisini azaltır. Böylece mikroorganizmalar aktive olmamış makrofajların sitoplazmasında serbestçe çoğalabilirler. İkinci cephe TH₁ yanıtının tetiklenmesidir. Bu süreç mikobakterilerin sindirilmesi ve bileşenlerinin hücre yüzeyinde sunulmasıyla başlar ve makrofajların sitokinler ile aktive edilmesiyle sonlanır. İnfeksiyonun kısa ve uzun vadeli sonuçları makrofaj aktivasyon sürecinin *M. tuberculosis* suşlarının hücre içindeki üstünlüğü ile mücadelesine bağlıdır [15-20].

İnfeksiyonun erken safhalarında, *M. tuberculosis* taşıyan makrofajlar lenfatik kanallar aracılığıyla hiler lenf nodüllerine ulaşır ve burada ek bir infeksiyon odağı

oluşur. Buradan bakteriler karaciğer, dalak, böbrek, kemik, beyin, meninksler veya akciğerlerin diğer bölgeleri gibi çeşitli dokulara yayılır. Enfeksiyonun ilk odağı ile birlikte genişlemiş hiler lenf nodülleri primer kompleksi oluşturur. Enfekte ineğin sütü içilmişse primer kompleks bademcikler ve servikal nodülleri veya bağırsaklar ve de mezenterik lenf nodüllerini kapsar. Benzer bir şekilde bölgesel lenf nodüllerinin katılımıyla primer odak deri de olabilir. Tüberkülozun bu nadir tipi anatomi uzmanları, patologlar ve kasaplar gibi et ile uğraşan kişilerde görülen bir meslek hastalığıdır [2,15].

Primer lezyonda *M. tuberculosis* hücreleri çoğalırken makrofajlar ve dendritik hücreler sitokinler (tümör nekroz faktör, interlökin-12, interferon gamma [IFN- γ]) salarak T hücreleri ve diğer inflamatuvar hücreleri enfeksiyon bölgesine çekerler. CD4 T hücreleri, müteakip 3-9 hafta boyunca makrofajların primer aktivatörünün IFN- γ olduğu TH₁ tipi immün yanıtı başlatır. Bu haftalar boyunca bakteriler çoğalıp, aynı zamanda gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı oluşturmak için gerekli miktarda mikobakteriyel proteinler oluşturabilirler. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı sürece yıkıcı bir unsur ekler ve TB’de hasarın bilinen tek nedenidir. Mikobakteriyel proteinlere spesifik gecikmiş tip duyarlılık yanıtı kalır ve bu yanıt tüberkülin deri testinin temelini oluşturur [15,17,19].

Granülom denilen mikroskopik bir yapıda TH₁ ve gecikmiş tip duyarlılık yanıtlarının karışımı meydana gelir. Granülom lenfositler, makrofajlar, epitileoid hücreler (aktive makrofajlar), fibroblastlar ve çok çekirdekli dev hücrelerden oluşur. Granülom büyüdükçe hipersensitivite reaksiyonunun yıkıcı doğası nekroza neden olur. Büyük lezyonlar, merkezindeki materyalin peynirimsi yarı katı yapısı nedeniyle kazeöz nekroz olarak tanımlanır [15,17,19].

Aktive makrofajlar TB etkeni bakterilerin çoğalmasını inhibe ederler fakat hücre içindeki bakterileri öldürme yetenekleri kısıtlıdır. Granülom içindeki metabolik olarak çok aktif olan makrofajlar oksijeni (O₂) tüketirler ve sonucunda lezyonun ortasında meydana gelen anoksi ve asidoz bakterilerin çoğunu öldürür. Granülom oluşumu genellikle primer enfeksiyonu sınırlanması için yeterlidir: lezyon pasif hale gelir, etrafındaki fibroblastlar kalın bir yara dokusu oluşturur, bu doku kalsifiye de olabilir. Bakteri yüklü makrofajların sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler aracılı apoptozu (programlı hücre ölümü) koruyucu bağışıklığa katkıda bulunur [2,17,20].

Vakaların az bir kısmında infeksiyon odaklarından biri ilerler ve progresif lokal lezyonlar, menenjit, plevra iltihabı, böbrek hastalığı, omurga ve diğer kemik ve eklemlerin hastalığı dahil primer hastalığın ciddi belirtileri ortaya çıkar. Odak içeriğini bir damara boşaltırsa, bakteriler tüm vücuda yayılır ve çok sayıda granülom oluşur. Bu form milier TB olarak bilinir [2].

Primer TB ya asemptomatiktir ya da sadece ateş ve halsizlikle kendini gösterir. Akciğer grafisinde, akciğerlerin orta bölgelerinde infiltrasyon ve hilus etrafında genişlemiş lenf nodülleri görülebilir. Bu lenf nodülleri fibrinleşir ve bazen de kalsifiye olur, bu gerçekleştiğinde grafide karakteristik bir görüntü (Ghon kompleksi) ortaya çıkar [15].

Post primer tüberküloz:

Dormant odakların reaktivasyonu veya eksojen reinfeksiyon, primer hastalıktan farklıdır (Bkz Tablo 2-1). Tam olarak bilinmeyen sebeplerle reaktivasyon veya reinfeksiyon tüberkülozu akciğerlerin üst loblarında gelişme eğilimi gösterir. Granülom oluşma süreçleri aynıdır fakat reaksiyonun nekrotik unsuru yaygın doku yıkımına ve tüberküloz denilen geniş kazeasyon bölgelerinin oluşmasına neden olur. Aktive makrofajlardan serbestleşen proteazlar kazeöz materyali yumuşatır ve sıvılaştırır; tümör nekroz faktör ve diğer immünolojik araçların aşırı miktarda üretilmesiyle hastalık için karakteristik olan tükenme ve ateş meydana gelir [2,17,19].

Tablo 2-1. Primer ve post primer tüberkülozun temel farklılıkları.

Özellik	Primer	Post primer
Lokal lezyon	Küçük	Geniş
Lenfatik tutulum	Var	Minimal
Kavite oluşumu	Nadir	Sık
Tüberkülin reaktivitesi	Negatif (başlangıçta)	Pozitif
İnfektivite*	Nadir	Sık
Bölge	Akciğerin herhangi bir bölgesi	Apikal Bölge
Lokal yayılım	Nadir	Sık

* Pulmoner vakalar

Tüberkülozun iç kısmı asidik ve anoksiktir ve az sayıda canlı bakteri içerir. Bununla birlikte zamanla genişleyen lezyon bronş duvarını aşındırır ve sıvılaşmış bileşenler bronş içine boşaltılır, böylelikle iyi havalandırılmış bir kavite oluşur. Kavite oluştuğunda yüksek miktarda mikroorganizma balgama geçer ve hasta açık ve infeksiyöz bir vaka haline gelir. Post primer tüberkülozda, organizmaların lenf

nodüllerine ve diğer organlara yayılması nadir görülür. Bunun yerine infeksiyon bronşiyal ağaç boyunca yayılır ve akciğerlerin daha alt bölgelerinde ve bazen de trakea, larinks ve ağızda sekonder lezyonlar gelişir. Balgamdaki mikroorganizmaların yutulması bağırsaklarda lezyon oluşmasına yol açar. Sekonder lezyonlar renal tüberküloz vakalarında mesane ve epididimde de oluşabilir. Post primer kutanöz tüberküloz (lupus vulgaris) genellikle yüz ve boyunu etkiler. Tedavi edilmezse büyük yara ve deformite oluşmasına neden olur. Çoğu lupus vulgaris vakasında etken *M. bovis*'tir ve günümüzde gelişmiş ülkelerde nadiren görülür [2,17,19].

Reaktivasyon tüberkülozu:

İmmün yanıt *M. tuberculosis* 'in hücre içinde çoğalmasını durdurursa primer infeksiyon ilerlemez. Bakterilerin çoğalması durur, lezyon fibroz oluşumu ile iyileşir ve mikroorganizmalar yavaşça ölür. Bu süreç diğer birçok infeksiyöz organizmada da görülür ve infeksiyon bu şekilde sonlanır, ancak TB'de oksijen ve besin yokluğunda mikroorganizmaların bazıları ölmez ve dormant (uyku hali) duruma geçer. Bu değişime neden olan spesifik faktörler bilinmemektedir fakat *M. tuberculosis* 'in hücre duvarında yer alan balmumu benzeri yapının bu koşullar altında bakterilerin hayatta kalmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu organizmalar akciğerlerde ve diğer bölgelerde aylar, yıllar ve hatta dekatlar boyunca varlıklarını sürdürerek tekrar aktive olmayı beklerler. Primer infeksiyondan sonra çoğu kişide orijinal popülasyonun tamamen yok olması veya reaktivasyon için gereken koşulların oluşmaması nedeniyle reaktivasyon hiçbir zaman gerçekleşmez [15,17,19].

Her ne kadar mikobakteriye ait faktörler (resüsitasyonu teşvik edici faktör) tanımlanmış olsa da bu dormant odakların reaktivasyon mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Genellikle bağışıklık sisteminin zayıflaması sorumlu tutulmaktadır. Yeni odaklar genellikle oksijen basıncı nispeten yüksek, aerop *M. tuberculosis* 'in üremesi açısından elverişli olan vücut bölgelerinde (en yaygın olarak akciğerlerin üst bölgeleri) bulunur. Nekroz sıklıkla küçük bir bronşun duvarında yer alır ve nekrotik materyal buradan bronş içine boşaltılır, bu da pulmoner kavite oluşumu ve bronşiyal yayılım ile sonuçlanır. Sıklıkla küçük kan damarları da hasara uğrar [15,19].

Primer infeksiyondan sonra iyileşen kişilerin yaklaşık %10'unda yaşamlarının bir noktasında klinik hastalık (sekonder TB) gelişir. Batılı ülkelerde dormant lezyonların reaktivasyonu sıklıkla 50 yaş üstü kişilerde görülür ve erkeklerde daha

yaygındır. Reaktivasyon malnütrisyon, diyabet, ilerlemiş yaş ve kişinin hayatında meydana gelen dramatik değişiklikler nedeniyle bağışıklık sisteminin baskılanmasıyla ilişkilidir. TB'nin yaygın olduğu bölgelerde reaktivasyon, daha sık genç erişkinlerde ergenlik ve hamileliğin eşlik ettiği immünsüpresyon nedeniyle görülür. Son zamanlarda primer TB'nin ilerlemesi ve reaktivasyonu, daha genç erişkinlerde AIDS'in bir komplikasyonu olarak artmıştır [15].

İnsanda TB hastalığına MTBC üyeleri neden olur. MTBC tek bir türün genetik olarak birbirine çok yakın ($> \%95$ DNA-DNA homolojisi gösteren) varyantlarından oluşan bir gruptur. Bu kompleksin üyeleri aşağıda sıralanmıştır [2,14,21,22].

- *M. tuberculosis*: İnsanlarda TB'nin en sık görülen etkenidir.
- *M. bovis*: Sığırlar ve insanlar dahil birçok diğer memelide TB'nin başlıca etkenidir.
- *M. africanum*: İnsan ve sığır tiplerinin ara formudur. İnsan tüberkülozuna neden olur ve esas olarak ekvatorial Afrika'da bulunur. Tip 1 Batı Afrika'da daha yaygındır ve *M. bovis* ile ortak birçok özelliği bulunur; tip 2 ise ağırlıklı olarak Doğu Afrika kökenlidir ve *M. tuberculosis* 'e daha çok benzer.
- *M. caprae*: Keçilerden izole edilmiştir ve veteriner cerrahlarda az sayıda TB vakasına neden olmuştur.
- *M. pinnipedii*: Fok balıklarında nadir görülen patojendir ve mesleki olarak fok balıkları ile birlikte olan insanlarda çok seyrek olarak TB'ye neden olur.
- *M. microti*: Tarla faresi ve diğer küçük memelilerde çok nadir karşılaşılan bir patojendir ve insanlarda atenuedir. Bununla birlikte hem bağışıklık sistemi sağlam hem de baskınlanmış insanlarda TB nedeni olarak tanımlanmıştır.
- *M. canettii*: Kompleksin çok nadir görülen ve genetik olarak primitif bir üyesidir.
- *M. mungi*: Kompleksin en yeni üyesidir, bantlı firavun farelerinden izole edilmiştir.

2.2.1. Epidemiyoloji

Tüberküloz hala tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur. DSÖ “Küresel Tüberküloz 2014 Raporu”na göre dünya genelinde tüberküloz insidans, prevalans ve mortalite oranları düşmektedir; bununla birlikte küresel tüberküloz yükü halen çok yüksektir. Bu rapora göre, 2013 yılında 9 milyon kişide TB geliştiği, 1,5 milyon kişinin TB nedeni ile hayatını kaybettiği ve TB nedenli ölümlerin 360.000’inin HIV (+) kişilerde görüldüğü tahmin edilmektedir. DSÖ’ye 2013 yılında 5,7 milyonu yeni vaka ve 0,4 milyonu tedavi görmekte olan vaka olmak üzere toplam 6,1 milyon TB vakası bildirilmiştir. Bu da, 2013 yılında geliştiği tahmin edilen 9 milyon TB vakasının yaklaşık % 64’ünün saptanabildiğini ve sonuç olarak, tanı konulamayan ya da tanı konulmuş olsa da ulusal TB programlarına bildirilmeyen yaklaşık 3 milyon vaka olduğunu göstermektedir [5].

İki bin on üç yılında TB geliştiği tahmin edilen 9 milyon kişinin yarısından fazlası (%56) Güney Doğu Asya ve Batı Pasifik bölgelerinde bulunmaktadır. Vakaların yaklaşık dörtte biri ise Afrika bölgesinde görülmüştür, bu bölge aynı zamanda popülasyona göre en yüksek vaka ve ölüm oranlarına sahiptir. Toplam vakaların % 24 ve %11 ‘i sırasıyla Hindistan ve Çin’de ortaya çıkmıştır [5].

TB vakaları ve TB nedenli ölümlerin yaklaşık %60’ı erkeklerde görülmekle birlikte kadınlar arasında da hastalık yükü çok yüksektir. İki bin on üç yılında 510.000 kadının TB nedeniyle hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. TB nedeniyle ölen kadınların üçte birinden fazlasının HIV (+) olduğu belirtilmiştir. HIV (–) çocuklarda 2013 yılında 550.000 (aralık, 470.000-640.000) TB vakası ve 80.000 (aralık, 64.000-97.000) TB nedenli ölüm görüldüğü tahmin edilmektedir [5].

İki bin on üç yılında TB gelişen 9 milyon kişinin 1,1 milyonunun (%13) HIV (+) olduğu tahmin edilmektedir. HIV (+) TB vakalarının ve HIV (+) kişilerde görülen TB nedenli ölümlerin beşte dördü Afrika bölgesinde görülmektedir [5].

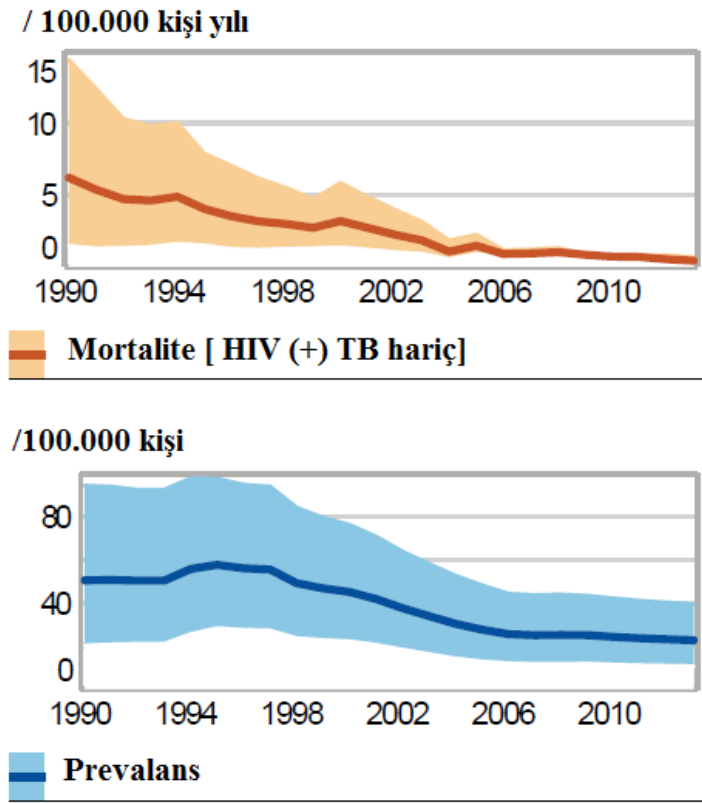
Yeni vakaların % 3,5’inin ve önceden tedavi görmekte olan vakaların ise %20,5’inin ÇİD-TB olduğu; ortalama olarak ÇİD-TB vakalarının %9’unun da YİD-TB olduğu tahmin edilmektedir. Bildirilen tüm TB vakalarının (6,1 milyon) hepsine duyarlılık testlerinin yapılmış olması durumunda 2013 yılında 300.000 ÇİD-TB vakasının saptanmış olacağı belirtilmiştir. ÇİD-TB olduğu tahmin edilen 300.000 vakanın 136.000’i saptanmış ve bildirilmiştir. Bu da yaklaşık olarak her iki vakadan

birinin (%45) tespit edildiğini göstermektedir, 2009 yılında bu oranın altı da bir olduğu düşünüldüğünde dirençli TB vakalarının saptanmasında ilerleme kaydedildiği görülmektedir [5].

Tedavi başarı oranı 2013 yılında yüksek seyretmiş, tüm yeni vakaların yaklaşık % 86'sında tedavi başarılı olmuştur. Her ne kadar Avrupa bölgesinde tedavi başarı oranında 2011 yılından bu yana ilerleme kaydedilmişse de 2012 yılında %75 ile ortalamanın altında kalmıştır [5].

İki bin on üç yılında toplam 97.000 hastaya ÇİD-TB tedavisi başlanmıştır ve 2009 yılı ile karşılaştırıldığında 2013 yılında ÇİD-TB tedavisi başlanan hasta sayısında 3 kat artış olduğu görülmektedir. ÇİD-TB tedavisi sonuçları ile ilgili en güncel veriler 2011 yılında tedavisi başlanan hastalara aittir. Küresel başarı oranının %48 olduğu belirtilmiştir. ÇİD-TB yükü yüksek olan 27 ülkenin beşinde (Etiyopya, Kazakistan, Myanmar, Pakistan ve Viyetnam) tedavide $\geq$ %70'lik başarı oranı elde edilmiştir [5].

Ülkemizdeki TB verilerine bakacak olursak, DSÖ'nün 2014 yılında yayımladığı raporunda 2013 yılı için mortalite HIV (–) vakalarda 100.000 kişide 0,42 (0,24-0,65), HIV (+) vakalarda 100.000 kişide 0,01 (0,01-0,02); prevalans HIV (+) vakalar dahil 100.000 kişide 23 (11-39); insidans, HIV (+) vakalar dahil 100.000'de 20 (19-22), HIV (+) TB insidansının ise 100.000'de 0,1 (0,1-0,1) olduğu belirtilmiştir. İki bin on üç yılında toplam 13.409 vaka bildirildiği ve bunların 239'unun önceden tedavi görmüş olduğu, 818'inde ise relaps görüldüğü belirtilmiştir. Bildirilen 12.352 yeni vakanın 4.561'inin ekstrapulmoner vaka olduğu belirtilmiştir. Toplam 13.170 yeni ve relaps görülen vaka olduğu bu vakaların 581'inin (%4) 15 yaş altı çocuklarda görüldüğü ve erkek/kadın oranının 1,4 olduğu belirlenmiştir. ÇİD-TB oranı yeni vakalarda %2,5 (2,1-3), önceden tedavi görmüş vakalarda ise %18 (15-21) olarak bulunmuştur. TB hastalarının 8.787'inin HIV durumunun bilindiği ve HIV (+) hasta sayısının 32 olduğu belirtilmiştir. Tedavi başarı oranı 2012 yılında tedavisi başlanan yeni vakalarda %88, önceden tedavi görmüş olan vakalarda %66, HIV (+) vakalarda ise %51 olarak bulunmuştur. İkinci seçenek ilaçlar ile tedavisi 2011 yılında başlanan RİF'e dirençli TB/ÇİD-TB vakalarının %66'sında ve YİD-TB vakalarının tümünde (%100) tedavi başarılı olmuştur. TB mortalitesi ve prevalansının yıllar içindeki değişim grafikleri şekil-2.1'de verilmiştir [23].



Şekil 2-1. DSÖ'nün verilerine göre Türkiye'de TB mortalitesi ve prevalansı

2.2.2. Laboratuvar Tanısı

TB'nin kesin tanısı etken mikroorganizmanın kültür besiyerinde üretilmesiyle yapılır.

2.2.2.1. Örneklerin toplanması ve işlenmesi:

Aside dirençli bakteriler (ARB'ler) vücuttaki hemen her doku ve organı infekte edebilirler. Organizmanın başarılı bir şekilde izole edilmesi alınan örneğin kalitesine ve mikobakteriyoloji laboratuvarında kullanılan yöntemlerin duyarlılığına bağlıdır [13,14].

Balgam örnekleri

Pulmoner TB tanısı için balgam veya indüklenmiş balgam örnekleri tercih edilir. Birbirini izleyen üç gün boyunca sabah balgamı alınmalıdır. Tükürük ve nazal sekresyonlar alınmamalıdır ve hastaların bu süreçte oral antiseptik kullanmaları önerilmektedir. Hasta kendiliğinden balgam çıkartamıyorsa aerosol ile indüklenmiş balgam örneği alınır. İndüklenmiş balgam talimatları uygulayabilen ayaktan hastalardan alınmalıdır. On ml balgam örneği alınmalı ve örnekler hemen laboratuvara ulaştırılmalıdır. Hemen işleme alınamayacak örnekler buzdolabında bekletilmelidir [13,14].

Bronşiyal aspiratlar, bronkoalveolar lavaj örnekleri, ince iğne aspiratları ve akciğer biyopsi örnekleri

Balgam çıkartamayan bazı hastalarda invaziv tekniklerin uygulanması gerekebilir. Çapraz kontaminasyonun önlenmesi için bronkoskopun temizlenmesine özel önem gösterilmesi gerekir. Ayrıca, çevresel mikobakteriler içerebileceğinden bronkoskop musluk suyu ile temas etmemelidir. İnce iğne aspirasyonu ve açık akciğer biyopsisi tanı konulması zor olan vakalarda uygulanabilir [13,14].

Gastrik lavaj sıvısı (Açlık mide suyu)

Gastrik lavaj, gece boyunca balgamını yutan hastalarda tercih edilir. Bu prosedürün kullanımı, koma halindeki veya bunamış, yatan hastalar, 3 yaşından küçük çocuklar ve aerosol indüksiyonuyla balgam çıkaramayan hastalar ile sınırlıdır. Uyku sırasında yutulan balgamların toplanabilmesi için örneklerin sabah erkenden aç karnına alınması önerilmektedir. Üst üste üç gün boyunca 5-10 ml örnek alınmalıdır. Örnekler dört saat içerisinde işlenemeyecek ise laboratuvar, içerisinde 100 mg sodyum karbonat bulunan steril, tek kullanımlık kaplar temin etmelidir. Uzun süreli aside maruziyet

mikobakterilere zarar verdiği için nötralize edilmemiş örnekler kabul edilmemelidir [13,14].

İdrar örnekleri

Birbirini izleyen üç gün boyunca orta akım sabah idrarı alınmalıdır. Gece boyunca mikobakteriler mesanede biriktiği için en iyi sonuç sabah toplanan ilk idrardan alınır. Genellikle kültür için en az 40 ml idrar örneği gereklidir. Düşük hacimli veya 24 saatlik idrar örnekleri kabul edilmemelidir. Kateterizasyon, sadece orta akım idrar örneği alınamadığında uygulanmalıdır [13,14].

Vücut sıvıları

Aspirasyon ile veya cerrahi prosedürler sırasında mümkün olduğunca çok vücut sıvısı (örn., beyin omurilik sıvısı [BOS], plevra, periton, perikard sıvısı veya sinoviyal sıvı) aseptik olarak toplanmalıdır. Bazı vücut sıvıları (örn. BOS ve periton diyaliz sıvısı) çok az sayıda mikobakteri içerebileceğinden izolasyon oranını arttırmak için diğer sıvılardan daha fazla miktarda (örn. BOS için > 5ml) örnek alınması önerilir [13,14].

Doku (lenf nodu, deri ve diğer biyopsi örnekleri)

Mümkünse en az 1 g doku aseptik olarak steril bir kaba alınmalıdır. Doku parçası tuzlu su veya başka sıvılar içine alınmamalı ya da gazlı beze sarılmamalıdır. Kutanöz ülserlerde biyopsi örneği lezyonun periferinden alınmalıdır ve hem 30 °C hem de 37 °C 'de inkübe edilmelidir. Çok küçük biyopsi örnekleri az miktarda steril tuzlu su ile nemlendirilebilir.

Kontamine olduğu düşünülen büyük doku parçaları steril bistüri ve makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmalıdır sonrasında az miktarda steril tuzlu su veya %0,2 sığır albumini ile steril doku öğütücüsü ile homojenize edilmelidir. Bu süspansiyon daha sonra balgam örneği gibi işlenmelidir. Eğer steril olup olmadığı bilinmiyorsa homojenize edilmiş doku örneğinin yarısı direkt sıvı veya katı besiyerine ekilmeli diğer yarısı ise balgam örneği gibi işlenmelidir. Doku örneği aseptik koşullarda alınmışsa ve kontamine olmadığı düşünülüyorsa dekontamine edilmeden işlenebilir [13,14].

Yara, deri lezyonları ve aspiratlar

Bir deri lezyonu veya yaradan alınan örneğin kültürü yapılacaksa en iyi örnek toplama yöntemi aspirasyondur. Mümkün olduğunca çok örnek aseptik olarak aspire edilmelidir. Aspirasyondan önce deri alkol ile temizlenmelidir. Hacim aspirasyon için yeterli değilse cerahat ve eksüdalar eküvyon çubuğu ile alınıp transport besiyerine konulmalıdır, kuru eküvyon çubukları kabul edilmemelidir. Bununla birlikte eküvyon çubuğuna alınan örnekten yapılan kültürden elde edilecek negatif sonuç güvenilir kabul edilmediğinden bu durum kültür raporunda belirtilmelidir [13,14].

Kan örnekleri

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda, özellikle de HIV ile infekte kişilerde, dissemine mikobakteri infeksiyonları görülebilir. Bu infeksiyonların çoğunda etken *Mycobacterium avium* kompleksi (MAC) üyeleridir. Kan örneği ekim için laboratuvara gönderilecekse antikoagülan olarak sodyum polianetilen sülfat, heparin veya sitrat kullanılabilir. Etilendiamin tetraasetik asit içeren tüplere alınmış veya pıhtılaşmış kan örnekleri kabul edilmemelidir. Kan örneğinin direkt katı besiyerine ekilmesi önerilmez. Kan örneği hemen işleme alınamayacaksa oda sıcaklığında saklanmalıdır [13,14].

Dışkı örnekleri

Dışkı örneklerinden aside dirençli boyama ve/veya kültür, dissemine MAC infeksiyonu gelişme riski olan AIDS'li hastaları tanımlamak için kullanılmıştır. Bu uygulamanın klinik yararı tartışmalı olsa da preparat ve/veya kültür pozitifliğini genellikle diseminasyon izlemektedir. Dışkı örneklerinin konulacağı kaplar, temiz, kuru ve balmumu içermeyen kaplar olmalı ve koruyucu veya sulandırıcı madde içermemelidir. İdrarla kontaminasyondan kaçınılmalıdır [13,14].

Örneklerin işlenmesi

Steril olmayan klinik örneklerden ARB'lerin izole edilmesinde, dekontaminasyon-homojenizasyon ve konsantrasyon adımlarını içeren birkaç yöntem kullanılır. Steril bölgelerden alınan örnekler besiyerine direkt olarak veya konsantre edildikten sonra ekilir [13,14].

Kontamine örnekler

Mikobakteri kültürü için gönderilen örneklerin çoğu organik kalıntı (müsin gibi), doku, serum ve organizmalar ile kontamine diğer proteinöz materyalleri içerir. Buna en tipik örnek balgamdır. Laboratuvarlarda bu örnekler, hızlı üreyip mikobakterilerin üremesini baskılayabilecek mikroorganizmaların öldürülmesi veya sayısının azaltılması ve mikobakterilerin müsin ve/veya hücrelerden salınmasını sağlayacak şekilde işlenmelidir. Dekontaminasyon işleminden sonra mikobakterilerin izolasyon şansını arttırmak için örnekler konsantre (genellikle santrifüj ile) edilir.

Sık kullanılan dekontaminasyon-homojenizasyon yöntemleri arasında sodyum hidroksit (NaOH) yöntemi, N-asetil-L-sistein-NaOH (NALC-NaOH) yöntemi, Zefiran-trisodyum-fosfat yöntemi yer alır. Bir diğer yöntem olan oksalik asit yöntemi, Gram negatif çomak, özellikle *Pseudomonas* ve *Proteus* türlerini, içeren örneklerin işlenmesinde çok yararlıdır. NaOH sık kullanılan bir dekontaminant ve aynı zamanda mukolitikdir. Bir klinik örneği sıvılaştırmak için NALC, ditiyotretiol (sputolizin) ve enzimler gibi çeşitli maddeler kullanılabilir. Bu maddelerin hiç biri bakterileri inhibe etmez. Birçok yöntemde sıvılaştırma (organizmaların müsin veya hücrelerden salınması) işlemi, kapalı bir kaptaki bulunan örneğin vorteks tipi bir karıştırıcı ile güçlü şekilde karıştırılmasıyla yapılır. Karıştırıldıktan sonra kap 15 dakika bekletilerek oluşan aerosollerin çökmesi beklenir. Bu işlem sonunda tüpe pH 6,8 fosfat tamponu eklenerek dekontaminasyon işlemi durdurulur ve nötralizasyon aşaması başlatılır. Tüm bu işlemlerin laboratuvar güvenlik protokollerine uyularak biyogüvenlik kabinlerinde yapılması son derece önemlidir. Homojenizasyon-dekontaminasyon ve nötralizasyon sonrasında örnekler $\geq 3000 \times g$ 'de santrifüj edilerek konsantre edilirler [13,14].

Solunum yolu örnekleri dışında pek çok diğer örnek de normal flora içerir. Örneklerin işlenmesiyle ilgili özel durumlar aşağıda verilmiştir.

- Aerosol ile indüklenmiş balgam örneği, balgam örneği gibi işlenmelidir.
- Gastrik lavaj örnekleri alındıktan sonra 4 saat içerisinde işlenmeli veya %10 sodyum karbonat ile nötralize edilmeli ve balgam örneğinde olduğu gibi işlenene kadar buzdolabında bekletilmelidir.

- Aspirat örneği 10 ml'nin üzerinde ve sulu görünümlü ise, balgam örneklerinde yapıldığı gibi, örnek santrifüj edilip sedimenti işleme alınabilir [13,14].

Steril örnekler

Aseptik olarak alınan doku veya vücut sıvılarına genellikle homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemleri uygulanmaz. Kontamine olduğu belirlenen örnekler dekontamine edilmelidir.

BOS örnekleri aseptik koşullarda işlenmeli ve yeterli miktarda gelmişse santrifüj edilmelidir. Süpernatant atılmalı, sediment preparat yapılmadan ve besiyerine ekilmeden önce vortekslenmelidir. Miktarı yetersizse BOS örneğinden direkt preparat ve kültür yapılmalıdır.

Plevra sıvısı steril antikoagülan tüplere alınmalıdır. Eğer sıvı pıhtılaşır ise eşit miktarda sputolizin ile sıvılaştırılıp iyice karıştırılmalıdır Eklem sıvısı ve diğer steril eksüdalar aseptik olarak direkt besiyerine ekilebilir [13,14].

2.2.2.2. Aside dirençli boyama

ARB'lerin saptanmasında bazik fuksin boyası ve florokrom boyası kullanılan üç boyama yöntemi vardır: Ehrlich Ziehl-Neelsen (EZN), Kinyoun ve florokrom. Klinik örneklerden yapılan preparatlarda ARB görülmesi TB için sadece tahmini tanı olarak değerlendirilmelidir, çünkü boyama yöntemleri *M. tuberculosis* suşlarını spesifik olarak tanımlamaz. Bununla birlikte kaliteli örnekten düzgün bir şekilde hazırlanan preparatlarda yalancı pozitiflik oranı oldukça düşüktür. Fakat, preparatlarda ARB saptanması için konsantre edilmiş klinik örneğin ml'sinde en az 10^4 ARB bulunmalıdır [13].

2.2.2.3. Kültür

Kültür yöntemi uygulandığında ml'sinde 10^1 - 10^2 canlı bakteri bulunan klinik örneklerde bile mikobakterileri izole etmek mümkündür. Mikobakteri izolasyonu için seçici ve seçici olmayan besiyerleri kullanılabilir. Seçici besiyerleri, diğer bakterilerin ve mantarların üremesini inhibe etmek amacıyla bir veya daha fazla antimikrobiyal içerir. Mikobakterilerin ilk izolasyon sürecini hızlandırmak için sıvı besiyerleri tercih edilmektedir. Kültürden mikobakteri izolasyonunu optimize etmek için farklı tipte besiyerlerinin (en azından bir katı besiyeri ve bir sıvı besiyeri) kombine edilerek

kullanılması önerilir. Klinik örneklerden mikobakterilerin izolasyonunda kullanılan besiyerleri Tablo 2-2’de verilmiştir [13,14, 24-28].

Tablo 2-2. Klinik örneklerden mikobakterilerin izolasyonu için kullanılan besiyerleri.

KATI

Agar temelli

Middlebrook 7H10 (7H10)

Middlebrook 7H11 (7H11)

Yumurta temelli

LJ

Petragnani

American Trudeau Society

Selektif besiyerleri

LJ Gruft

Mycobactosel LJ

Mitchison’s selektif 7H11

SIVI

Middlebrook 7H9 buyyon (7H9)

Dubos tween albumin

Katı besiyerleri karakteristik koloni morfolojisinin görülmesini sağlamaları, inokulum miktarı az olsa bile üreme görülmesi ve kontaminasyon oranlarının düşük olması sebebiyle önerilmektedir. Yumurta temelli besiyerlerinin raf ömrü uzundur (buzdolabında aylarca saklanabilir), tamponlama kapasiteleri yüksektir ve çoğu mikobakterinin üremesini destekler. Ayrıca, bu besiyerleri ile inokulumda veya ortamda bulunan, mikobakteriler için toksik olabilecek maddeler de nötralize edilir. Fakat bu besiyerlerinin, kullanılan yumurtaların kalitesine bağlı olarak seriler arasında farklılık görülebilmesi, kalıntıların kolonilerden zor ayırt edilmesi ve ilaç duyarlılık deneylerinde doğru ve tutarlı ilaç konsantrasyonlarının sağlanmasında güçlük çekilmesi gibi dezavantajları bulunur. Agar temelli besiyerleri yumurta temelli olanlardan kimyasal olarak daha iyi tanımlanmıştır. Agar temelli besiyerleri şeffaftır ve böylelikle mikrokoloniler mikroskop altında inokulum kalıntılarından kolaylıkla ayırt edilebilir. Koloniler agar temelli besiyerlerinde 10-12 gün içerisinde görülebilir, yumurta temelli besiyerleri için bu süre 18-24 gündür. Agar temelli besiyerleri duyarlılık deneyleri için

kullanılabilir. Bununla birlikte bu besiyerleri pahalıdır ve raf ömürleri nispeten kısadır (buzdolabında saklama süresi bir ay). Agar temelli besiyerlerinin hazırlanması, inkübasyonu ve saklanması dikkat gerektirir, çünkü ısı ve ışığa aşırı maruziyet mikobakteriler için toksik bir madde olan formaldehitin açığa çıkmasına neden olabilir [13,14].

Kültürler yüksek nem ve %5-10 CO₂ varlığında karanlık ortamda 35 °C’de inkübe edilmeli ve koloni oluşumu yönünden haftada bir kontrol edilmelidir. Üreme görüldüğünde farklı yöntemlerle identifikasyon işlemi uygulanarak bakteriler tür düzeyinde tanımlanmalıdır. Sekiz haftalık inkübasyondan sonra üreme görülmeyen kültürler negatif olarak rapor edilmelidir [13,14].

Sıvı besiyerleri mikobakterilerin izolasyon süresini yaklaşık 10 güne indirir. Mikobakterilerin saptanması ve üretilmesi için sıvı besiyeri kullanılan çeşitli sistemler mevcuttur, bunlardan en sık kullanılanları Tablo 2-3’de verilmiştir. Sıvı besiyerinde üreme saptandığında ARB varlığını teyit etmek için kültürden preparat hazırlanıp aside dirençli boyama yöntemleri ile boyanır ve katı besiyerine pasaj alınır. Kontaminasyondan şüpheleniliyorsa Gram boyama yöntemi de uygulanabilir [13,14].

Tablo 2-3. Mikobakterilerin izolasyonunda sık kullanılan sıvı besiyeri içeren sistemler.

Sistem	Temel prensip
Septi-Chek AFB sistemi (BD Biosciences)	Modifiye 7H9 buyyon ile çikolata, yumurta temelli ve modifiye 7H11 agar içeren üç bölmeli kanattan oluşan bifazik kültür sistemidir. Şişe düzenli olarak çevrilerek katı besiyelerine inokülasyon sağlanır.
MGIT 960 (BD, Biosciences)	Kültür şişeleri 7H9 buyyon ve silikon sensör için gömülü floresan madde içerir. Üreme ultraviyole ışık kullanılarak saptanır. O ₂ , sensörden floresan çıkışını azaltır, böylelikle besiyerinde üreyen mikrororganizmalarca O ₂ tüketildiğinde floresan ışımaya artar. Cihaz üremeyi floresan sensörü aracılığıyla O ₂ tüketimini izleyerek saptar.
BacT/Alert (MB/ Bac T) Sistemi (bioMerieux)	Mikoorganizmalar modifiye 7H9 buyyona ekilir. Cihaz üremeyi her şişede bulunan kolorimetrik CO ₂ sensörü aracılığıyla CO ₂ üretimini izleyerek saptar.
BACTEC 9000 MB (BD Biosciences)	Mikoorganizmalar modifiye 7H9 buyyona ekilir. Cihaz üremeyi floresan sensörü aracılığıyla O ₂ tüketimini izleyerek saptar.
ESP Kültür Sistemi II (Trek Diagnostic Systems)	Mikroorganizmalar zenginleştirilmiş 7H9 buyyona ekilir. Kültürün yüzey alanı selüloz bir sünger ile arttırılmıştır. Üreyen mikrororganizmalarca O ₂ tüketilmesi ve gaz üretilmesi basınç değişikliklerine neden olur. Cihaz üremeyi, basınç değişikliklerini izleyerek saptar.

Bunların yanı sıra MODS ve TLA gibi konvansiyonel olmayan kültür yöntemleri de bulunmaktadır. MODS, ilaç içeren ve içermeyen sıvı besiyerlerine klinik örneklerin inokülasyonunu takiben mikrokoloni ve tipik kord oluşumunun invert mikroskop ile gözlenmesine dayanan bir yöntemdir [7]. Bu yöntemde ilaç içeren ve içermeyen sıvı besiyerine hastalardan alınan örnekler direkt olarak inoküle edilmekte ve kültürler erken üreme veya mikrokoloni oluşumu yönünden mikroskopta incelenmektedir. *M. tuberculosis* suşlarının sadece ilaçsız besiyerinde üremesi pozitif kültürü ifade ederken, hem ilaçsız hem de ilaçlı besiyerinde üremesi ilaca direnci göstermekte ve kültür ile duyarlılık sonuçları aynı anda alınabilmektedir [8].

TLA, ilaç içeren ve içermeyen katı besiyerlerine örneklerin inokülasyonunu takiben mikrokoloni oluşumunun mikroskopik olarak incelendiği bir direkt yöntemdir [7].

2.2.2.4. İdentifikasyon

Kullanılan izolasyon yöntemlerinden bağımsız olarak katı veya sıvı besiyerlerinde üreyen mikroorganizmalar ilk olarak aside dirençli boyama yöntemlerinden biri ile boyanmalıdır ve ARB oldukları kanıtlanmalıdır. Mikobakteriler genellikle ilk başta üreme hızı ve pigment oluşturma özelliklerine göre gruplandırılır, sonrasında bu özelliklerinden yola çıkarak identifikasyon için uygulanacak kilit biyokimyasal testler seçilir. Ancak biyokimyasal yollarla yapılan identifikasyon işlemleri oldukça uzun sürelidir, üç hafta gibi bir süreye gereksinim vardır. Bununla birlikte maalesef farklı türlerin biyokimyasal profilleri ve morfolojik özellikleri birbiri ile çakışabilmektedir (Tablo2-4) ya da suşun özellikleri değişebilir. Benzer bir şekilde suşlar arasında farklılık görülebilir ve tanımlanmak istenen suşun özellikleri tür için tipik suşun özellikleri ile aynı olmayabilir. Bu durum, özellikle henüz karakteristik bir fenotipin belirlenmediği 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) sekanslarına göre yeni tanımlanan türler için geçerlidir. Mikobakterilerin identifikasyonu için alternatif laboratuvar yöntemleri mevcuttur ve bunlar arasında kromatografik yöntemler, nükleik asit problemleri ve nükleik asit sekanslama kullanılarak yapılan genetik araştırmalar yer alır [13,29].

Fenotipik testler

Mikobakterilerin, özellikle de tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM'lerin), tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel yöntemler (fenotipik testler) üreme parametreleri ve biyokimyasal özelliklerine dayanır. Bu testlerin tümü uzun süre gerektirir ve külfetlidir ve sıklıkla kesin sonuç alınamaz.

Mikobakteriler ilk önce üreme hızı ve sıcaklığı ve pigment oluşturma özelliklerine göre altgruplara ayrılıp, sonrasında tür veya kompleks düzeyinde tanımlanmalıdır. Bu amaçla, ilk yapılan gruplandırmaya göre seçilen biyokimyasal testler uygulanır. Mikobakterilerin tanısında kullanılan biyokimyasal testler aşağıda sıralanmıştır [13,29].

- Niasin testi
- Nitrat redüksiyon testi
- Katalaz testi
- Tiyofen-2-karboksilik asid hidrazid (T2H) ile üremenin inhibe edilmesi
- Pirazinamidaz testi
- Tween 80 hidroliz testi
- Arilsülfataz testi
- Tellurit redüksiyonu
- Üreaz testi
- Sodyum klorür (NaCl) tolerans deneyi
- Demir alımı
- Mac Conkey agarda üreme

Tablo 2-4. Klinik örneklerden izole edilen ve kültürde üretilen mikobakteri türlerinin ayırt edici özellikleri

Gruplandırma	Tür	Optimum üreme sıcaklığı (°C)	Koloni morfolojisi ^a	Pigmentasyon ^b	Niasin	T2H'da üreme (10 µg/ml)	Nitrat reduksiyonu	SK- Katalaz (kabarcıkların mm'si)	Katalaz (68 °C)	Tween hidrolizi	Tellürit reduksiyonu	%5 NaCl'ye tolerans	Aril sülfataz (3 gün)	Üreaz	Pirazinamidaz (4 gün)
TB kompleksi															
	<i>M. tuberculosis</i>	37	R	N (100)	+(95)	+	+ (97)	<45 (89)	– (1)	± 68	–/(36)	– (0)	– (0)	± (64)	+
	<i>M. bovis</i>	37	Rt	N (100)	–	–	– (9)	<45 (69)	– (2)	– (21)	ND	– (0)	– (0)	± (50)	–
	<i>M. bovis BCG</i>	37	R	N (100)	–	–	–	< 45	–	–/+	ND	–	–	+	–
	<i>M. africanum</i>	37	R	N (100)	V	V	V	< 45	–	–	–	–	–	+	+
	<i>M. canettii</i>	37	Sm	N (100)	–	+	+	< 45	–	–	ND	ND	–	ND	+
	<i>M. microti</i>	37	Sm	N (100)	+	–	V	< 45	–	ND	ND	ND	ND	+	+
	<i>M. caprae</i>	37	Sm	N (100)	–	–	–	< 45	–	–/+	ND	–	–	ND	ND
	<i>M. pinnipedii</i>	37	R	N (100)	V	ND	–	< 45	–	–	ND	ND	ND	ND	ND
Nonkromojenler															
	<i>M. avium</i>	35-37	Smt/R	N	–	+	–	< 45	±	–	+	–	–	–	+
	<i>M. intracellulare</i>	35-37	Smt/R	N	–	+	–	< 45	±	–	+	–	–	–	+
	<i>M. haemophilum</i> ^d	30	R	N	ND	+	–	< 45	–	–	–	–	–	–	+
	<i>M. mageritense</i>	30	Sm	N (88)	– (0)	+	– (1)	<45 (99)	–/+	+(99)	+(74)	– (0)	– (0)	– (9)	+
	<i>M. shimoidei</i>	37	R	N	–	+	–	< 45	–	+	ND	–	–	–	+
	<i>M. genavense</i>	37	Smt	N	–	+	–	> 45	+	–	ND	ND	–	+	+
	<i>M. celatum</i>	35	Sm/Smt	N (100)	–	+	– (0)	<45 (100)	+(100)	– (0)	+(100)	– (0)	+(100)	– (0)	+(100)
	<i>M. ulcerans</i>	30	R	N	–	+	–	< 45	+	–	ND	–	–	V	–
	<i>M. terrae</i> kompleksi	35	Sm/R	N (93)	– (1)	+	± (67)	>45 (93)	+(92)	+(99)	–/(46)	– (2)	– (2)	– (13)	V
	<i>M. triviale</i>	37	R	N (100)	– (0)	+	+(89)	>45 (100)	+(100)	+(100)	– (25)	+(100)	± (56)	–/(33)	V
	<i>M. gastri</i>	35	Sm/SR/R	N (100)	– (0)	+	– (0)	<45 (100)	– (11)	+(100)	± (50)	– (0)	– (0)	–/(44)	–
	<i>M. branderi</i>	35	Sm	N (100)	–	ND	–	–	–	–	ND	ND	– ^d	–	+
	<i>M. heidelbergense</i>	35	Sm	N (100)	–	ND	–	–	+	+	–	–	–	+	+
	<i>M. triplex</i>	35	Sm	N (100)	– (0)	+(100)	+(100)	>45 (100)	+(100)	– (0)	ND	– (0)	– (0),+ (50) ^d	+(100)	+
	<i>M. lacus</i>	37-42	SR	N	–	ND	+	< 45	–	Zayıf	+	–	Zayıf	+	+

Gruplandırma	Tür	Optimum üreme sıcaklığı (°C)	Koloni morfolojisi ^a	Pigmentasyon ^b	Niasin	T2H'da üreme (10 µg/ml)	Nitrat reduksiyonu	SK- Katalaz (kabarcıkların mm'si)	Katalaz (68 °C)	Tween hidrolizi	Tellürit reduksiyonu	%5 NaCl'ye tolerans	Arilsülfataz (3 gün)	Üreaz	Pirazinamidaz (4 gün)
Kromojenler															
	<i>M. kansasii</i>	35	Sm/SR/R	P (96)	– (4)	+	+	>45 (93)	+	+	–/+ (31)	– (0)	– (0)	–/+ (49)	–
	<i>M. marinum</i>	30	Sm/SR/R	P (100)	–/+ (21)	+	– (0)	< 45	– (30)	+	–/+ (39)	– (0)	–	+	+
	<i>M. avium</i>	35-37	Sm/R	S	–	+	–	< 45	±	–	+	–	–	–	+
	<i>M. intracellulare</i>	35-37	Sm/R	S	–	+	–	< 45	±	–	+	–	–	–	+
	<i>M. simiae</i>	37	Sm	P (90)	± (63)	+	– (28)	>45 (93)	+	– (9)	+	– (0)	– (0)	+	+
	<i>M. asiaticum</i>	37	Sm	P (86)	– (0)	+	– (5)	>45 (95)	+	+	– (20)	– (0)	– (0)	– (10)	–
	<i>M. xenopi</i>	42	Sm	N/S ^e	–	+	–	< 45	–/+	–	ND	– (0)	+	–	ND
	<i>M. goodii</i>	37	Sm	S (99)	– (0)	+	– (1)	>45 (90)	+	+	– (29)	– (0)	V	V (31)	–/+
	<i>M. scrofulaceum</i>	37	Sm	S (97)	– (0)	+	– (5)	>45 (84)	+	– (2)	± (64)	– (0)	V	V	±
	<i>M. szulgai</i>	37	Sm/R	S/P (93)	– (0)	+	+	>45 (98)	+	–/+ (49)	± (53)	– (0)	–	+	+
	<i>M. flavesens</i>	37	Sm	S (100)	– (0)	+	+	>45 (94)	+	+	–/+ (44)	± (62)	– (0)	+	+
	<i>M. parvum</i>	37	Sm	S	–	+	–	< 45	+	+	–	–	–	+	ND
	<i>M. kansasii</i>	37	Sm	S	ND	ND	–	> 45	ND	–	ND	ND	– (20)	–	ND
	<i>M. palustre</i>	37-42	Sm	S/P	ND	ND	V (54)	< 45	ND	+	ND	ND	V (46)	+	+
	<i>M. lentiflavum</i>	35	Sm	S	–	ND	–	± (V)	± (V)	–	ND	ND	–	–	± (V)
	<i>M. interjectum</i>	35	Sm	S	–	ND	–	V	+	–	ND	ND	V	+	+
	<i>M. bohemicum</i>	37-40	Sm	S	–	ND	–	< 45	+	–	ND	–	–	Zayıf	–
	<i>M. tusciae</i>	30	R	S	–	+	+	–	–	+	ND	–	– ^d	+	ND
	<i>M. heckeshornense</i>	35	Sm	S	–	ND	–	–	+	–	ND	–	–	–	–
Hızlı üreyenler															
	<i>M. fortuitum</i> grubu	28-30	Sf/Rf	N (100)	–	+	+	>45	+	V	+	+	+	+	+
	<i>M. chelonae</i>	28-30	Sm/R	N (100)	–/+	+	–	>45	V	V	+	–	+	+	+
	<i>M. abscessus</i>	28-30	Sm/R	N	–	–	–	>45	V	V	+	+	+	+	+
	<i>M. smegmatis</i>	28-30	R/Sm	S (50)	–	+	+	>45	+	+	+	+	–	–	–

22 ve 23 numaralı kaynaklardan değiştirilerek alınmıştır. Artı ve eksi işaretleri sırasıyla özelliğin varlığını ve yokluğunu gösterir. ND, Belirlenemedi; SK, semikantitatif; V, değişken; ± genellikle var; -/+ genellikle yok. Test edilen suşların pozitif yüzdesi parantez içinde verilmiştir ve test sonucu bu yüzdelere bağlıdır.

^a R, pürüzlü; Sm, düz; SR, orta pürüzlü; Smt, düz ve transparan; Rt, pürüzlü ve ince veya transparan; Sf, düz ve filamentöz uzantıları olan; Rf, pürüzlü ve filamentöz uzantıları olan

^b P, fotokromojenik; S, skotokromojenik; N, nonkromojenik (*M. szulgai* 37 °C'de skotokromojenik ve 24°C'de fotokromojeniktir; *M. palustre* 37 °C'de skotokromojeniktir, ve 42 °C'de bu suşların %85'i fotokromojeniktir)

^c Üreme faktörü olarak hemin gerekir

^d 14. günde arilsülfataz reaksiyonu pozitifdir

^e Genç kültürler nonkromojenik olabilir veya zamanla artan hafif soluk bir pigmenti vardır

Kromatografik yöntemler

Mikolik asit analizi. Mikobakterilerin identifikasyonu için mikobakteriyel lipidlerin analiz edildiği kromatografik yöntemler arasında, ince tabaka kromatografi, gaz-sıvı kromatografi (GLC), kapiller gaz kromatografisi yöntemleri ve yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yer almaktadır.

HPLC yöntemi ile büyük hücresel metabolitler ve bileşenler ayrıştırılabilmektedir. Mikobakterilerin hücre duvarında bulunan mikolik asit esterlerinin HPLC ile analizinin birçok mikobakteri türünün tanımlanmasında hızlı ve güvenilir olduğu gösterilmiştir. Uzun zincirli mikolik asitler HPLC ile GLC'den daha iyi ayrıştırılır, çünkü bu asitler GLC yönteminde uygulanan yüksek sıcaklıklara duyarlıdır. HPLC paternleri tür veya grup düzeyinde görsel veya matematiksel olarak tanımlanabilmektedir ve identifikasyon için sadece birkaç saat gerekir [13,29].

MPT64 antijeni saptanması. BD MGIT TBc Identifikasyon Testi (TBc ID) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD), pozitif MGIT besiyerlerinde MTBC antijeninin kalitatif olarak saptanmasında kullanılan hızlı immünokromatografik bir testtir. TBc ID ile MTBC üyelerinden *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* ve *M. microtii* suşları tanımlanabilmektedir. Bu test ile kültür sırasında MTBC hücrelerinden salınan mikobakteriyel protein fraksiyonu MPT64 tespit edilir. Örnekler test cihazına eklendiğinde, MPT64 antijeni, test stripinde görünen partiküllere konjuge olmuş MPT64 antikörlerine bağlanır. Antijen-konjugat kompleksi, test stripi üzerinden reaksiyon alanına ilerler ve membrana uygulanan ikinci bir özel MPT64 antikoru tarafından yakalanır. Örnekte MPT64 antijeni varsa, etiketli koloidal altın partikülleri tarafından bir renk reaksiyonu oluşur ve pembe ile kırmızı renklerde bir çizgi olarak görülür [30].

Moleküler yöntemler

Mycobacterium cinsinden mikroorganizmaların identifikasyonu için iyi tanımlanmış ve ucuz konvansiyonel yöntemler olsa da bu yöntemler zaman alıcı ve zahmetlidir, aynı zamanda sıklıkla kesin sonuç alınamaz. Mikobakterilerin identifikasyonunda moleküler yöntemlerin kullanılmaya başlanması identifikasyon süresinin kısılmasını ve daha kesin sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır [13].

Klinik örneklerden spesifik nükleik asit sekansları polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve ilgili teknikler ile çoğaltılabilmektedir. Kapalı sistemlerin ve türe spesifik 16S ribozomal RNA'ların amplifikasyonunda izotermal tekniklerin kullanılmaya başlanmasıyla başlangıçta karşılaşılan düşük duyarlılık, yalancı pozitif reaksiyonlar ve çapraz kontaminasyon sorunlarının üstesinden gelinebilmiştir [2] .

DNA hibridizasyonu. DNA hibridizasyonu katı veya sıvı besiyerinde üretilen, yaygın görülen bazı mikobakteri türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Mikobakteriyel rRNA sekanslarına spesifik işaretlenmiş (örn. akridinium esteri ile) DNA probları ticari olarak (GenProbe, San Diego, ABD) mevcuttur. Mikobakterilerden sonikasyon veya ısı aracılığıyla rRNA'lar açığa çıkartılır. Elde edilen rRNA ile spesifik DNA probunun reaksiyona girmesi ve stabil bir DNA-RNA hibridi oluşması sağlanır. Hibridlenmemiş DNA probları kimyasal olarak ayrıştırılır. Kemilüminesansı ortaya çıkarmak için alkalın hidrojen peroksit solüsyonu eklendiğinde sadece hibride bağlı akridinium esterleri ışık yayar ve yayılan ışık miktarı hibridlenmiş prob sayısı ile direkt olarak ilişkilidir. Oluşan ışık, kemilüminometre ile ölçülür [13].

Amplifikasyon ve ters hibridizasyon ile amplifikasyon. Ticari veya in-house nükleik asit amplifikasyon testleri sıvı kültürde (MGIT gibi) üretilen MTBC'lerin erken identifikasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. INNO-LIPA *Mycobacteria*; (Innogenetics, Ghent, Belçika) ve Genotype *Mycobacterium* CM/AS (Hain Lifesciences GmbH, Nehrin, Almanya) bu yöntemle çalışan kitlerdir [13,31].

Amplifikasyon ve restriksiyon enzim analizi veya DNA sekanslama. Mikobakterilerin PCR temelli sekanslama ile tanımlanması, mikobakteriyel DNA'nın gen spesifik primerler ile PCR amplifikasyonu ve ampikonların sekanslanmasından oluşur. Mikroorganizma, nükleotid sekansı referans sekanslar ile karşılaştırılarak tanımlanır. Bu yaklaşımda en sık kullanılan hedef tüm bakteri türlerinde bulunan 16S rRNA'yı kodlayan genidir. Bu bölge hem korunmuş, hem de değişken bölgeleri içerdiğinden identifikasyon için ideal bir hedeftir [13].

İdentifikasyon için yaygın olarak kullanılan bir diğer ticari olmayan yaklaşım yüksek düzeyde korunmuş bir bölgenin (hsp65 geni gibi) PCR ile çoğaltılıp, PCR ürünü üzerinde restriksiyon enzim analizi yapılmasıdır. Restriksiyon enzimleri ile muamelenin ardından parçalanmış ürünler jel elektroforezi ile ayrıştırılır. Restriksiyon fragman paternleri türe spesifiktir ve bu sayede birçok TDM türü ayırt edilebilir [13].

DNA mikroarray. Çok sayıda DNA sekansının tek bir hibridizasyon basamağı ile hızlı bir şekilde incelenmesi için DNA mikroarray cazip bir yöntemdir. Bu yaklaşım eş zamanlı olarak mikobakteri türlerinin identifikasyonunda ve RİF direncine yol açan mutasyonların saptanmasında kullanılır. Bakteri kolonilerinden elde edilen floresan işaretli PCR amplikonları nükleotid probolar içeren DNA arrayler ile hibridize edilir. Bağlı amplikonlar floresan bir sinyal yayarlar ve bu sinyal bir tarayıcı ile saptanır. Bu yaklaşım ile 82 ünik 16S rRNA sekansı 54 mikobakteri türünün ayırt edilmesini sağlar, ayrıca (RİF direncine yol açan) *rpoB* gen mutasyonlarını içeren 54 sekans da bulunur [13].

Gerçek zamanlı PCR. GeneXpert sisteminde kullanılmak üzere tasarlanan Xpert MTB/RIF (Cepheid, ABD) deneyi, yarı kantitatif, nested, gerçek zamanlı PCR deneyidir. Xpert MTB/RIF deneyi ile ARB pozitif veya ARB negatif balgam örneklerinde ya da balgam örneklerinden elde edilen konsantre sedimentte MTBC DNA varlığı ve *rpoB* geninde RİF direnci ile ilişkili mutasyonlar belirlenmektedir. Bu deneyin TB şüphesi olan ve tedavisi başlamamış olan hastalara ait örneklerle uygulanması önerilir. TB tedavisi görmekte olan hastalara ait örneklerden MTBC varlığının veya RİF direncinin belirlenmesi için kullanılması onaylanmamıştır [32-35].

2.2.3. Antimikobakteriyel ilaçlar ve duyarlılık deneyleri

Mikobakteriler, lipidlerce zengin hücre duvarlarının geçirgen olmayan yapısı nedeniyle birçok antimikrobiyal ilaca doğal olarak dirençlidir. Bununla birlikte TB tedavisinde etkili olduğu gösterilen ilaçlar da mevcuttur. TB tedavisinde kullanılan ilaçlar birinci seçenek ve ikinci seçenek ilaçlar olarak ayrılır. Birinci seçenek ilaçlar, etkinliği uzun süreli klinik deneyim ile desteklenen ve yan etkileri ile başa çıkılabilen ilaçlardır. İkinci seçenek ilaçlar, daha az tercih edilen, toksik etkileri yüksek ve ilk seçenek ilaçlara direnç görülmesi durumunda kullanılan ilaçlardır [2].

2.2.3.1. Antimikobakteriyel ilaçlar

2.2.3.2. Birinci seçenek antimikobakteriyel ilaçlar

İsoniazid (INH)

İsoniazid, klinik etkinliğinin gösterildiği 1952 yılından beri en yaygın kullanılan antimikobakteriyel ilaç olmuştur. Bir piridin halkası ve hidrazid grubundan oluşan İNH, yapısal olarak etionamid ve pirazinamid ile ilişkili olan bir nikotinamid analogudur. Belirgin bakterisidal etkisi sayesinde, son 20 yılda artan sıklıkta İNH direnci bildirilmesine rağmen, ilk seçenek anti-TB tedavi rejimlerinin önemli bir bileşenidir [36,37].

İsoniazid konak hücrelere hızla penetre olup *M. tuberculosis* 'in hücre zarından diffüze olur. İNH bir ön ilaçtır ve *M. tuberculosis* 'e ait katalaz peroksidaz enzimi KatG tarafından oksidatif aktivasyona gereksinim duyar. Her ne kadar İNH'nin aktif metabolitlerinin nükleik asit, fosfolipid sentezi ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) metabolizması dahil birçok esansiyel hücresel yol izini inhibe ettiği gösterilmişse de ilacın bakterisidal etkisinden sorumlu olan inhibe ettiği başlıca yol izi mikolik asit sentezidir. İlacın aktif formu, yağ asidi uzamasında gerekli olan mikobakterilerin yağ asit sentaz II sisteminin bir bileşeni olan NADH- bağımlı enoil açıl taşıyıcı protein (ACP) redüktaz InhA'ya sıkıca bağlanır. İNH direkt InhA ile etkileşime girmez. X-ışını kristallografi ve kütle spektrofotometresi verileri ilacın aktif formunun InhA'nın aktif bölgesinde bulunan NAD'ın nikotinamid halkasına kovalent bağlar ile bağlandığını ve NADH'ın InhA'dan ayrılmasına neden olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte İNH'nin *M. tuberculosis* hücreleri üzerindeki bakterisidal etkisinin mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır [36,37,38].

İsoniazid en yaygın olarak kullanılan anti-tüberküloz ilaç olduğundan klinik suşlar arasında İNH'a direnç diğer herhangi bir ilaçtan daha sık rastlanmaktadır. İNH'a dirençli suşlarda en sık *katG* geninde mutasyonlara rastlanılmaktadır (vakaların %50-80'inde). Bu gendeki mutasyon katalaz peroksidazın ön ilacı aktive etme yeteneğini azaltmaktadır. Mutasyon tipine ve KatG enzim fonksiyonunun ne dereceye kadar korunduğuna bağlı olarak İNH'nin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) 0,2 ila 256 mg/L aralığında değişir [36,37].

İsoniazide direnç *inhA* genindeki mutasyonlar sonucu da ortaya çıkabilir, bu gendeki mutasyonlar genellikle düşük seviye dirence (MİK=0,2-1 mg/l) neden olurlar.

Bu gendeki mutasyonlar İNH direncine ek olarak yapısal olarak ilişkili olduğu ikinci seçenek ilaç etionamide karşı dirence de neden olur [36,37].

Nikotinamid adenin dinükleotid dehidrogenazı kodlayan *ndh* genindeki mutasyonlar *M. smegmatis* suşlarında İNH ve etionamid direncine neden olmaktadır ve *katG* veya *inhA* genlerinde mutasyon bulunmayan İNH'a dirençli klinik *M. tuberculosis* suşlarında saptanmıştır. Dahası *kasA* ve *ahpC* genlerindeki mutasyonlarda İNH'a direnç ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, İNH'a dirençli tüm klinik suşların 4'te birinde yukarıda bahsedilen genlerin hiçbirinde mutasyon bulunmamaktadır, bu da İNH'a dirence neden olan alternatif mekanizmaların varlığına işaret etmektedir [36,37].

Rifampisin (RİF)

Rifampisin geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve TB tedavisinde en yaygın kullanımı olan rifamisinler Rifamisinler *Amycolatopsis mediterranei*'den ilk kez 1957 yılında izole edilmiştir. Bu ilaçların standart anti-TB tedavi rejimlerine eklenmeleri tedavi süresinin 18 aydan 9 aya indirilmesini mümkün kılmıştır. Her ne kadar rifamisinlerin erken bakterisidal etkisi İNH'dan düşük olsa da, rifamisinler TB kemoterapisindeki en güçlü sterilizan ilaçlardır ve tedavi süresince persistan mikobakterileri öldürmeye devam ederler [36-38].

Rifampisin, lipofilik profili sayesinde *M. tuberculosis* hücre zarından kolaylıkla diffüze olur. Bakterisidal etkisinden bakteriyel DNA bağımlı RNA polimeraza yüksek afiniteyle bağlanarak transkripsiyonu inhibe etme yeteneği sorumludur [36-38].

M. tuberculosis 'de İNH'a tekli direnç nispeten yaygın olsa da, tek başına RİF direnci nadir görülür ve RİF'e dirençli suşların %90'ından fazlası aynı zamanda İNH'a da dirençlidir. *M. tuberculosis* suşlarında RİF'e direnç 10^7 ila 10^8 organizmada bir görülmektedir ve en yaygın olarak RNA polimerazın β alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninde tekli nokta mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Bununla birlikte RİF'e dirençli suşların küçük bir kısmında (< %5) *rpoB* geninde herhangi bir mutasyona rastlanmaz, bu da RİF permeabilitesinde değişme veya diğer RNA polimeraz alt ünitelerindeki mutasyonlar gibi alternatif direnç mekanizmalarının varlığına işaret etmektedir [36-38].

Etambutol

Etambutolün anti-TB etkisi ilk kez 1961 yılında bildirilmiştir ve şu anda kısa süreli duyarlı TB tedavisinde İNH, RİF ve pirazinamid ile birlikte kullanılmaktadır.

İNH gibi etambutol de başlıca aktif olarak çoğalan mikobakterileri öldürür ve sterilizan etkisi çok zayıftır.

Etambutolün etkilediği primer yol izinin hücre duvarı arabinan polimerizasyonunun inhibisyonu yoluyla arabinogalaktan biyosentezi olduğu öne sürülmektedir. Aynı zamanda etambutolün RNA metabolizması, hücre duvarına mikolik asitlerin taşınması, fosfolipid sentezi ve spermidin biyosentezi gibi birçok diğer yolizini de inhibe ettiği bildirilmiştir [36-38].

Pirazinamid

Pirazinamidin 1952 yılındaki keşfinden ve TB vakalarının tedavisinde rutin olarak kullanılmaya başlanmasından beri kabul edilebilir relaps oranlarının elde edilmesi için gerekli tedavi süresi 9-12 aydan 6 aya düşmüştür. Her ne kadar bakterisidal etkisi RİF ve İNH'dan düşük olsa da sterilizan etkisinin güçlü olması ve tedavi süresini kısaltma potansiyeli pirazinamidin asidik ortamlarda bulunan yarı dormant mikobakterileri hedef alma yeteneğine dayandırılmıştır [36,37].

Pirazinamid pirazin-2-karboksilik asidin amid türevidir ve nikotinamid analogudur. Anti-TB etkisinin bundan 60 yıl önce tanımlanmış olmasında rağmen etki mekanizması iyi bilinmemektedir. Sterilizan etkisinin tedavinin ilk iki ayıyla sınırlı kalması nedeniyle pirazinamidin infeksiyonun erken infalatuvar evrelerinde akciğerlerdeki asidik bölümlerde bulunan mikobakterilere karşı etki ettiği öne sürülmüştür. Pirazinamid TB etkeni mikobakterilere pasif olarak ve ATP bağımlı taşıyıcı sistem aracılığıyla girer. İlaç *M. tuberculosis* 'e özgü olan etkisiz bir efluks sistemi sayesinde hücre içerisinde birikir. Pirazinamid İNH gibi bir ön ilaçtır ve aktif formu olan pirazinoik aside pirazinamidaz enzimi aracılığıyla dönüştürülmesi gerekmektedir. İlacın hücre içerisine alınması ve pirazinoik asidin hücre içerisinde birikmesi ekstraselüler pH asidik olduğunda artar. Pirazinamidin anti-TB etkisi asidik pH'larda esansiyel membran taşıma fonksiyonları için gerekli proton itici gücün pirazinoik asit tarafından bozulmasına dayandırılmaktadır. Bununla birlikte olası spesifik hücresel hedeflere yönelik araştırmalar devam etmektedir [36,37].

İkinci seçenек antimikobakteriyel ilaçlar

Aminoglikozitler

Streptomisin 1940'lı yılların başlarında bulunmuştur. Her ne kadar İNH, RİF ve pirazinamide dördüncü ilaç olarak streptomisin veya etambutol eklenmesinde relaps oranları benzer bulunmuşsa da streptomisinin oral emiliminin zayıf olması nedeniyle parenteral uygulama gereksinimi ve aminoglikozitlerin toksisite profili nedeniyle ilk seçenек anti-TB tedavisinde etambutol kullanımı tercih edilmiştir. Kayda değer antimikobakteriyel etkisi olan diğer aminoglikozitler arasında kanamisin ve amikasin yer alır. Aminoglikozitler şu anda ikinci seçenек ilaçlar olarak ve başlıca ÇİD-TB tedavisinde kullanılmaktadır.

Diğer bakterilerde olduğu gibi aminoglikozitler mikobakterilerde 30S ribozomal alt üniteye bağlanarak etki ederler. Bu bağlanma polipeptid sentezini etkileyerek translasyonun inhibe edilmesiyle sonuçlanır [36,37].

Florokinolonlar

Florokinolonlar (moksifloksasin, gatifloksasin, sparfloksasin, levofloksasin, ofloksasin ve siprofloksasin) *M. tuberculosis* suşlarına karşı çok etkili olan bakterisidal antibiyotiklerdir ve TB tedavisinde ikinci seçenек ilaçlar olarak kullanılırlar. Yeni nesil florokinolonların (moksifloksasin, gatifloksasin) TB tedavisinin süresinin kısaltılması amacıyla ilk seçenек ilaçlar olarak kullanımları klinik olarak değerlendirilmektedir.

Florokinolonlar DNA üzerinde giraz ve topoizomeraz IV ile üçlü kompleks oluşturup replikasyon çatalının ve transkripsiyon komplekslerinin hareketini engelleyerek antibakteriyel etki gösterirler. Diğer birçok bakteri türünün aksine *M. tuberculosis* 'de topoizomeraz IV bulunmaz, fakat DNA girazın A ve B alt ünitelerini kodlayan *gyrA* ve *gyrB* genleri mevcuttur [36,37].

Makrolidler

Makrolidler geniş spektrumlu antibiyotiklerdir ve antibakteriyel etkilerini bakteriyel 50S ribozom alt ünitesine bağlanıp RNA bağımlı protein sentezini inhibe ederek gösterirler. Bu ilaçların yabani tip *M. tuberculosis* suşlarına karşı sınırlı etkisi bulunmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda makrolidlerin diğer antibiyotiklerle kombine edilmesinin sinerjistik etki gösterdiği bildirildiğinden makrolidlerin TB tedavisindeki muhtemel rolü aktif bir araştırma konusudur [36,37].

Etionamid

Etionamid, İNH ile yapısal olarak benzeyen bir sentetik bileşiktir. Etionamid bir ön ilaçtır ve monooksigenaz EthA ile aktive edilmesi gerekir. İNH ile benzer şekilde etionamid ACP redüktaz InhA'ya bağlanarak mikolik asit sentezini inhibe eder. Yüksek seviye etionamid direnci (MİK >50 mg/L) olan *M. tuberculosis* suşlarının yaklaşık ¾'ünde *ethA* veya *inhA* genlerinde mutasyon bulunmaktadır. Yakın zamanda başka olası direnç mekanizmaları da tanımlanmıştır. *mshA* delesyon mutantlarında mikotiyol biyosentezinin defektif olduğu ve ilaç aktivasyonun kusurlu olması sonucunda etionamid direnci görüldüğü belirtilmiştir [36,37].

Rifabutin ve Rifapentin

Bir spiroperidil rifamisin olan rifabutin ve bir siklopenil rifamisin olan rifapentin *M. tuberculosis* 'e karşı güçlü in vitro aktivite gösterir. Rifabutin aynı zamanda MAC üyelerine karşı da çok etkindir ve HIV ile infekte hastalarda profilaktik olarak kullanıldığında dissemine MAC hastalığı insidansını düşürdüğü gösterilmiştir. Her iki ilacın da etki mekanizması ve direnç mekanizması RİF ile identik olsa da RİF'e dirençli olan *M. tuberculosis* suşlarının yaklaşık %30'u rifabutin ve rifapentine duyarlıdır. Bu durum, *rpoB* geninde belirli spesifik mutasyonlar ile ilişkilidir [36].

Kapreomisin

Kapreomisin *Streptomyces caeolus*'dan izole edilen bir makrosiklik polipeptid antibiyotiktir. Kapreomisin, streptomisin ve kanamsin gibi 16S rRNA'daki ribozomal yapıları modifiye ederek protein sentezinin inhibe eder. *M. tuberculosis* 'de kapreomisin ve kanamisin direnci 16S rRNA'yı kodlayan *rss* genindeki mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir [36,37].

Sikloserin

Sikloserin bir d-alanin analogudur ve d-alanin rasemaz ve d-alanin:d-alanin ligaz enzimlerinin inhibe ederek peptidoglikan sentezini engeler [37,58].

Paraaminosalisilik asit (PAS)

Paraaminosalisilik asitin folik asit biyosentezi ve demir alımını inhibe ettiği düşünülmektedir. Folat biyosentezinde timidilat sentaz enzimini kodlayan *thyA* genindeki mutasyonlar PAS'a dirençli klinik *M. tuberculosis* suşlarında tanımlanmıştır,

bu da PAS'ın folat antagonisiti olarak rol oynadığını öne sürmüştür. Bununla birlikte, incelenen PAS'a dirençli suşların sadece 1/3'ünden biraz daha fazlasında *thyA*'da mutasyon bulunması PAS'a dirence yol açan ek mekanizmaların varlığına işaret etmektedir [36,37].

Yakın zamanda TB tedavisinde kullanılmak üzere birkaç yeni ilaç geliştirilmiştir. Çoğunlukla bu ilaçların etki mekanizması klasik anti-TB ilaçlarından farklı olsa da rutin kullanıma alınmadan önce bile bu yeni ilaçların bazılarında dirençli suşlar tanımlanmıştır [37].

Bu yeni ilaçlar arasında nitroimidazoller (PA-824, OPC-67683), bedakuilin (TMC207, R207910 veya J bileşiği de denen bir diarilkinolon), SQ109, fenotiazinler, oksazolidinonlar (linezolid, PNU-100480, AZD5847), benzotiazinonlar yer almaktadır [37].

2.2.4. Duyarlılık deneyleri

Tüm hastalarda, izole edilen ilk *M. tuberculosis* suşuna in vitro ilaç duyarlılık deneyleri yapılmalıdır. Hızlı üreyen aerob veya fakültatif anaerob bakterilerde sıklıkla kullanılan yöntemler birçok mikobakteri türü için uygun değildir. Mikobakterilerin antimikrobiyallere duyarlılığını saptamak için kabul görmüş yöntemler mikroorganizmaların tek bir ilacı belirlenmiş konsantrasyonda içeren katı veya sıvı besiyerinde üremesine dayanır [13,36].

Duyarlılık deneyleri direkt veya indirekt yöntemler ile yapılabilir. Direkt yöntemde mikroskopta 100 x immersiyon alanında 50'den fazla ARB içeren preparat pozitif klinik örneklerin konsantratları inokulum olarak kullanılır, indirekt yöntem de ise inokulum kaynağı kültürde üretilen bakterilerdir. Her ne kadar direkt yöntem daha hızlı sonuç alınmasını sağlasa da, bu yöntem tam olarak standardize edilmemiştir ve kontaminasyon görülebilir, bu nedenle indirekt yöntem daha çok tercih edilir [13].

M. tuberculosis'de ilaç direnci, ilacın kritik konsantrasyonuna (KK'sına) göre belirlenir. Bir ilacın KK'sı, test edilen bakteri popülasyonunun %1'inden fazlasının üremesini inhibe eden (%99) ilaç miktarı olarak tanımlanır [13,39].

M. tuberculosis suşlarının çeşitli antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılığının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan dört konvansiyonel (standart) yöntem mevcuttur: agar proporsiyon, agar proporsiyon yönteminin prensiplerinin sıvı

besiyerinde uygulandığı ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kılavuzlarında yer alan ticari sistemler (MGIT 960 ve Versa TREK sistemleri), mutlak konsantrasyon ve nispi direnç [13,39].

A. Konvansiyonel yöntemler

1. Fenotipik Yöntemler

a. Agar proporsiyon yöntemi:

Agar proporsiyon yöntemi yavaş üreyen mikobakterilerin ilaçlara duyarlılığının belirlenmesi için 1960'lı yılların başlarında geliştirilmiştir. Bu yöntem daha sonrasında modifiye ve standardize edilmiştir ve pirazinamid hariç diğer ilaçlara MTBC suşlarının duyarlılığının belirlenmesinde standart yöntem olarak kabul edilmiştir. Bu yöntemde, denenen her ilaç için standardize inokulumun farklı dilüsyonları, kontrol ve ilaç içeren katı besiyerlerine inoküle edilir. Değerlendirme için ilaç içermeyen kontrol besiyerinde ayrı, sayılabilen en az 50 koloni gözlenmelidir, aksi halde deney geçersiz sayılmalı ve tekrar edilmelidir. İlaç içeren besiyerindeki koloni oluşturan birim (cfu) sayısı, kontrol besiyeri ile karşılaştırıldıktan sonra bu sayı yüzde olarak ifade edilir. İlaç içeren besiyerinde, kontrol besiyerinde üreyen koloni sayısının %1'inden fazlasının üremesi o ilaca karşı direnci ifade eder [13,36,39,40].

b. MGIT 960 sistemi:

MGIT 960 sistemi ile yapılan duyarlılık deneyleri, agar proporsiyon yönteminin sıvı besiyeri içeren sistemde uygulanması esasına dayanır. Dört-13 günde sonlanan kalitatif bir testtir. Test, izole edilen *M. tuberculosis* suşlarının ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki üremelerinin karşılaştırılması esasına dayanır. MGIT 960 cihazı tüplerdeki floresans artışını sürekli olarak izler. Cihaz yardımıyla ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki floresans analizleri karşılaştırılarak duyarlılık sonuçları belirlenir. Cihaz otomatik olarak bu sonuçları yorumlar ve mikroorganizmayı denenen ilaca duyarlı ya da dirençli olarak bildirir [36].

c. VersaTREK sistemi:

VersaTREK (önceden ESP II kültür sistemi olarak adlandırılmaktaydı) sisteminin prensibi sıvı besiyerlerinde kapak ile besiyeri arasında kalan üst katmandaki gaz basıncında meydana gelen değişikliklerin saptanmasına dayanır. İlaç içermeyen kontrol tüpündeki üreme zamanına göre belirlenen inkübasyon periyodu sonunda,

denenen suşun ilaca duyarlı olup olmadığı belirlenir. Kontrol tüpünde üreme olduğunda saptama zamanı hesaplanır. İlaç içeren tüpler, kontrol tüpü pozitifleştikten sonraki 3 gün boyunca izlenir. İlaç içeren tüplerde kontrol tüpüyle aynı günde veya sonraki 3 gün içerisinde üreme olması suşun ilaca dirençli, ilaç içeren tüplerde üreme olmaması veya kontrolden 3 günden fazla bir süre sonra pozitifleşmesi suşun ilaca duyarlı olduğunu gösterir [36].

d. Mutlak konsantrasyon yöntemi:

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine, ml'sinde 2×10^3 veya 1×10^4 cfu mikobakteri içeren inokulum ekilerek uygulanan bir yöntemdir ve ilaçlı besiyerinde 20 cfu'den daha fazla koloni oluşumu bakterinin o ilaca dirençli olduğunu gösterir. Bu yöntemle farklı ilaç konsantrasyonları ile çalışılarak denenen ilacın MİK değerleri saptanabilir [13,40,41].

e. Nispi direnç yöntemi:

Bu yöntemde test edilen mikroorganizma ile standart suşun (H37Rv) direnci karşılaştırılır. İlacın 2 kat seri dilüsyonlarını içeren besiyerlerine, her iki suşun standart inokulumları paralel olarak inoküle edilir. Direnç, test edilen ilacın denenen suşa karşı MİK değerinin, standart suşa karşı MİK değerine oranı olarak ifade edilir. Oranın 2 veya daha altında olması duyarlılığı 8 veya daha üstünde olması ise direnci ifade eder [13,40,42].

2. Genotipik yöntemler:

M. tuberculosis varlığının ve İNH ve/veya RİF direncinin saptanması için birtakım moleküler deneyler tasarlanmıştır [32].

a. Line-prob yöntemleri. Bu deneyler, mikobakteri suşlarından veya direkt olarak klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu, PCR ile nükleik asit sekanslarının amplifikasyonu, strip üzerine sabitlenmiş oligonükleotid probalar ile işaretlenmiş PCR ürünlerinin hibridizasyonu ve problemlerin bulunduğu bölgelerde çizgilerin görülmesini sağlayan kolorimetrik oluşumu içeren çeşitli basamaklar içermektedir [32,43].

İlk line-prob yöntemi olan INNO-LIPA Rif TB (Innogenetics NV, Belçika) ile MTBC varlığı ve eş zamanlı olarak *rpoB* bölgesinde RİF direnci ile ilişkili mutasyonlar saptanmaktadır. INNO-LIPA Rif TB ile gerçekleştirilen klinik değerlendirmelerin sonuçları bu yöntemin RİF direncini doğru olarak tespit edebildiğini, ancak bazı

değerlendirmeler deneyin MTBC'nin saptanmasında duyarlılığının düşük olduğunu göstermiştir. Bir meta analizde yayımlanan 14 çalışmanın 12'sinde deney kültürde üretilen suşlar ile yapıldığında RİF direncini saptamada duyarlılığının $> \%95$, özgüllüğünün ise $\%100$ olduğu gösterilmiş, bununla birlikte deneyin direkt olarak klinik örneklerle uygulandığı 4 çalışmada özgüllüğünün $\%100$, duyarlılığının $\%80-100$ arasında olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu deneyin kültürde izole edilen suşların RİF'e direncini belirlemede yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğu, ancak yöntem direkt klinik örneklerle uygulandığında duyarlılığının daha düşük olduğu belirtilmiştir [32,43,44].

İkinci line-prob yöntemi olan GenoType MTBDR (Hain LifeScience, Almanya) testi, daha sonra GenoType MTBDR*plus* ismiyle daha fazla sayıda *rpoB* ve *katG* mutasyonunu, ayrıca düşük düzey İNH direncini tespit edebilmek için *inhA* geninde mutasyonları saptayabilecek şekilde modifiye edilmiştir. Her ne kadar bu yeni test ile yapılan 2 değerlendirmede İNH direncini saptamada gelişme gözlenmişse de, diğer 3 değerlendirmede İNH'a direnci saptama oranının (özellikle düşük düzeyde dirençli suşlarda) suboptimal düzeyde kaldığı belirtilmiştir. GenoType MTBDR ve GenoType MTBDR*plus* deneyleri ile yapılan çalışmalara ait veriler toplandığında RİF direncini saptamada duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla $\%98$ ve $\%99$; İNH direncini saptamada duyarlılık ve özgüllükleri $\%84$ ve $\%100$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar her iki yöntemin de RİF'e direnci saptamada oldukça başarılı olduğunu; ancak İNH'a direnci saptamada özgüllükleri yüksek olsa da duyarlılıklarının tatmin edici düzeyde olmadığını göstermektedir. Yöntemin versiyonuna (eski veya yeni) ve örneğin tipine göre yapılan gruplandırılmış analizde deneylerin özgüllüğünde bir fark görülmemiş fakat tek başına GenoType MTBDR*plus* deneyi ile yapılan çalışmalara ait sonuçlar toplandığında yöntemin İNH direncini saptamada duyarlılığının $\%96$ 'ya kadar çıktığı ve bu yöntemin İNH'a direncin saptanmasında da oldukça başarılı olduğu belirtilmiştir [32,43,45].

b. Oligonükleotid microarray. Oligonükleotid microarray teknolojisi birden çok genetik sekansın eş zamanlı olarak saptanmasına olanak tanımaktadır. Bu teknoloji, mikroorganizmaların saptanması için korunmuş bölgeler ve/veya ilaç direncine yol açan mutasyonların saptanması için kullanılabilir. Bu testlerden biri olan TB-Biochip (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Rusya) sisteminin *M. tuberculosis* 'in RİF'e direncini belirlemedeki performansı değerlendirmiştir. Microarrayi konvansiyonel

antibiyotik duyarlılık deneyleri ile karşılaştıran küçük bir çalışmada, deneyin RİF'e direncin belirlenmesindeki duyarlılığı %80 olarak bulunmuştur [32].

c. Gerçek zamanlı PCR

Xpert MTB/RIF deneyinde kullanılan primerler *rpoB* geninin 81 baz çiftinden oluşan merkez bölgesini çoğaltır. Problar, korunmuş yabancı tip sekanslar ile RİF direnci ile ilişkili mutasyonların ayırt edilmesini sağlar.

GeneXpert sisteminde kendinden kapalı çalışan bir PCR cihazı, bilgisayar, barkod okuyucu ve testlerin çalıştırılması ve sonuçların gösterilmesi için önceden yüklenmiş bir yazılım bulunur. Cihazın kendinden kapalı olması ve laboratuvar olanakları açısından daha az sofistike alt yapıya gereksinim duyması nedeniyle sistemin diğer moleküler testlere oranla avantajı yüksektir. GeneXpert sisteminde örneklerin hazırlanması ve PCR işlemleri tek bir kartuşta birleştirilmiş ve tamamen otomatikleştirilmiştir. Tek kullanımlık bu kartuşlar bakterilerin parçalanması, nükleik asit ekstraksiyonu, amplifikasyonu ve amplikonların saptanması için gerekli tüm ayaçları içerdiğinden örnekler arasında çapraz kontaminasyon riski bulunmamaktadır. Xpert MTB/RIF deneyindeki tek manuel basamak balgam örneğine bakterisidal tampon eklenmesi ve akabinde ürün bilgilerinde belirtilen hacimde örneğin kartuşa aktarılmasıdır. Xpert MTB/RIF kartuşu GeneExpert cihazına yerleştirilir ve sonuçlar iki saat içerisinde alınır [32-34].

Xpert MTB/RIF deneyinin pulmoner TB tanısı ve RİF direncinin belirlenmesinde kullanımı DSÖ tarafından incelenmiştir ve pulmoner TB vakalarında RİF direncini saptamada duyarlılığı %95 (%95 Gİ, %90-97), özgüllüğü %98 (%95 Gİ, %97-99) olarak bulunmuştur [35,46].

B. Konvansiyonel olmayan yöntemler

Son yıllarda birçok konvansiyonel olmayan kültür ve ilaç duyarlılığı test yöntemleri geliştirilmiş ve gelişmiş labortuvar alt yapılarına ve teknik uzmanlığa sahip olmayan merkezlerde kullanımları amaçlanmıştır. Birkaç yöntem hızlı ve pahalı olmayan yöntemler olarak başta umut vaat etmiştir. Bunlardan en gelişmiş olanları MODS, TLA, NRA, mikobakteriyofaj temelli yöntemler, resazurin, alamar mavisi, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolyum bromür (MTT) ve 2,3-Bis(2-

metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT) gibi CRI yöntemleridir [7,8,9,47,48]

1. İlaç duyarlılığının mikroskopik gözlemi (MODS):

İlaç içeren ve içermeyen sıvı besiyerlerine klinik örneklerin inokülasyonunu takiben mikrokoloni ve tipik kord oluşumunun invert mikroskop ile gözlenmesine dayanan bir yöntemdir.

MODS, direkt veya indirekt olarak uygulanabilir. DSÖ'nün 2009 yılında yaptığı değerlendirmede hem direkt hem de indirekt test olarak kullanımı incelenmiştir ve MODS yönteminin RİF'e direnci saptamada yüksek duyarlılık (%98; %95 GA %95-%99) ve özgüllüğe (%99; %95 GA %96-%100), İNH için biraz daha düşük olmakla beraber yine yüksek duyarlılığa (%91; %95 GA %87-%95) sahip olduğu belirlenmiştir [7].

İlaça dirençli TB'nin hızlı tanısında MODS yöntemini değerlendiren meta analizde yöntemin RİF'e direncin belirlenmesinde duyarlılık ve özgüllüğünün sırasıyla %98,0 (%95 GA 94,5-99,3) ve %99,4 (%95 GA 95,7-99,9) olduğu bulunmuş; İNH'a direncin belirlenmesinde 0,1 µg/ml konsantrasyonda kullanıldığında duyarlılık ve özgüllüğü %97,7 (%95 GA 94,1-99,1) ve %95,8 (%95 GA 88,1-98,6) olarak bulunmuşken 0,4 µg/ml konsantrasyonda kullanıldığında duyarlılığının %90,0 (%95 GA 84,5-93,7)'a düştüğü fakat özgüllüğünün %98,6 (%95 GA 96,9-99,4)'ya yükseldiği belirlenmiştir [8].

Çok ilaca dirençli tüberkülozda direkt duyarlılık testlerinin karşılaştırıldığı bir meta analizde, MODS yönteminin *M. tuberculosis* suşlarında direncin saptanmasında duyarlılık ve özgüllük oranları sırasıyla RİF için sırasıyla %96 ve %96, İNH için sırasıyla %92 ve %96, olarak bulunmuştur [9].

Löenstein-Jensen besiyerinde yapılan konvansiyonel indirekt proporsiyon ilaç duyarlılık deneyleri ile karşılaştırıldığında MODS daha fazla iş yüküne, ek olarak invert mikroskop varlığına ve elde edilmesi daha zor olabilecek sarf malzemeye ihtiyaç duymaktadır. Sıvı besiyerinde yapılan konvansiyonel indirekt proporsiyon ilaç duyarlılık deneyleri ile karşılaştırıldığında ise MODS yöntemi ek iş yüküne, daha az ekipmana ve kolaylıkla elde edilebilecek sarf malzemeye ihtiyaç duymaktadır.

MODS yöntemi standardize edilmiştir. P-nitrobenzoik asit (PNB) içeren kuyucuk eklenerek revize edilen MODS yönteminin biyogüvenlik riskinin katı besiyerinde

yapılan konvansiyonel kültür ile benzer olduğu dolayısıyla da biyogüvenlik seviye 2 önlemlerine gerek duyduğu belirlenmiştir.

MODS yöntemi referans laboratuvarı seviyesinde kullanılmak için uygun bulunmuştur; düşük seviyeli laboratuvarların seviyesinin yükseltilmesi veya merkez laboratuvar haricinde uygulanması önerilmemektedir [7].

2. Kolorimetrik redoks indikatör (CRI) yöntemleri:

Kolorimetrik redoks indikatör yöntemleri indirekt testlerdir ve *M. tuberculosis* suşlarının anti-TB ilaçlarına in vitro ortamda maruz bırakılmasının ardından mikropoplaklardaki sıvı besiyerlerine renkli indikatör eklenip, üreme varlığında renkli indikatörün redüklenmesi prensibine dayanır. Kültürde üreyen *M. tuberculosis* suşları ile yapıldığından sıvı besiyeri kullanılarak yapılan konvansiyonel fenotipik yöntemler veya genotipik yöntemler ile kıyaslandığında ÇİD-TB'nin tanı süresini kısaltmaz [7].

Kolorimetrik redoks indikatör yöntemlerinde farklı indikatörler kullanılmaktadır bunlar arasında tetrazolium tuzları MTT ve XTT ve redoks indikatörleri alamar mavisi ve resazurin yer alır. RİF'e direncin saptanmasında farklı indikatörler kullanılarak yapılan CRI yöntemleri incelendiğinde deneylerin duyarlılık ve özgüllüğü indikatör olarak alamar mavisi kullanıldığında sırasıyla %89-%100 ve %97-%100; resazurin kullanıldığında sırasıyla %92-%100 ve %98-100; MTT kullanıldığında sırasıyla %94-%100 ve %99-%100 olduğu belirlenmiştir. Benzer bir şekilde İNH'a direncin saptanmasında farklı indikatörler kullanılarak yapılan CRI yöntemleri incelendiğinde deneylerin duyarlılık ve özgüllüğü indikatör olarak alamar mavisi kullanıldığında sırasıyla %94-%100 ve %89-%100; resazurin kullanıldığında sırasıyla %93-%100 ve %96-%100; MTT kullanıldığında sırasıyla %92-%100 ve %88-%100 olduğu belirlenmiştir [49-51].

Bu yöntemler 2009 yılında DSÖ tarafından değerlendirilmiştir ve RİF'e ve İNH'a direncin saptanmasında yüksek duyarlılığa (RİF için: %98; %95 GA %96-%99; İNH için: %97; %95 GA %96-%98) ve özgüllüğe (RİF için: %99; %95 GA %97-%99; İNH için: %98; %95 GA %97-%99) sahip olduğu gösterilmiştir [7].

İlaçlara duyarlılığın saptanması için LJ besiyerinde yapılan konvansiyonel indirekt proporsiyon deneyleri ile karşılaştırıldığında, CRI yöntemleri ek iş yüküne, benzer ekipmana fakat temin edilmesi zor olabilecek ek sarf malzemelerine ihtiyaç duymaktadır. Sıvı besiyerinde yapılan konvansiyonel indirekt proporsiyon yöntemi ile

karşılaştırıldığında ise CRI yöntemleri benzer iş yüküne, daha az ekipmana ve kolaylıkla elde edilebilecek sarf malzemeye ihtiyaç duymaktadır.

CRI yöntemleri referans laboratuvarı seviyesinde kullanılmak için uygun bulunmuştur; düşük seviyeli laboratuvarların seviyesinin yükseltilmesi veya merkez laboratuvar haricinde uygulanması önerilmemektedir [7]

3. Nitrat redüktaz deneyi (NRA):

M. tuberculosis suşlarının nitratı nitrite indirgememesinin renkli bir reaksiyon ile gösterilmesine dayanan direkt ve/veya indirekt bir yöntemdir. NRA preparat pozitif balgam örneklerinde direkt olarak veya konvansiyonel katı kültür besiyerinde üreyen *M. tuberculosis* suşları ile indirekt olarak uygulanabilir. Dolayısıyla NRA indirekt test olarak kullanıldığında katı besiyeri kullanılarak yapılan konvansiyonel fenotipik ilaç duyarlılık deneylerinden (katı besiyerinde uygulanan) daha hızlı değildir [7].

Nitrat redüktaz deneyinin performansının değerlendirildiği çalışmalarda bu yöntemin İNH'a ve RİF'e direnci saptamasında duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olduğu gösterilmiştir [47,52,53].

Kombine kullanımının (direkt ve indirekt) doğruluk verileri NRA'nın hem RİF'e hem de İNH'a direncin saptanmasında yüksek duyarlılık (sırasıyla, %97; %95 GA %95-%98 %97; %95 GA %95-%98) ve özgüllüğe (sırasıyla %100; %95 GA %99-%100, %99; %95 GA %99-%100) sahip olduğunu göstermiştir [7].

Nitrat redüktaz deneyinde kullanılan ayraçlar patent korumasında değildir ve nispeten ucuzdur. LJ besiyerinde yapılan konvansiyonel indirekt proporsiyon ilaç duyarlılığı deneyleri ile karşılaştırıldığında NRA benzer iş yüküne ve benzer ekipmana ihtiyaç duymaktadır ve ek sarf malzemesi gerektirmemektedir. Sıvı besiyerinde yapılan konvansiyonel indirekt proporsiyon yöntemiyle karşılaştırıldığında ise NRA daha az iş yüküne, ekipmana ve sarf malzemesine ihtiyaç duymaktadır [7].

Nitrat redüktaz deneyi prosedürleri standardize edilmiştir. NRA'da katı kültür besiyeri kullanılmaktadır ve bu nedenle katı besiyeri ile yapılan konvansiyonel kültür yöntemleri ile biyogüvenlik gereksinimleri benzerdir (biyogüvenlik seviye 2); bununla birlikte NRA ayraçlarının eklenmesi tüplerin düzenli olarak açılmasını gerektirmekte bu da aerosol oluşumu açısından önemli bir risk oluşturmaktadır ve dolayısıyla işlemlerin uygun biyogüvenlik kabinlerinde yapılması gerekmektedir [7].

Nitrat redüktaz deneyi referans laboratuvarı seviyesinde kullanılmak için uygun bulunmuştur; düşük seviyeli laboratuvarların seviyesinin yükseltilmesi veya merkez

laboratuvar haricinde uygulanması sadece bu laboratuvarların katı besiyeri kullanılan kültür yöntemlerinde uzmanlaştığı gösterilirse düşünülebilir [7].

4. İnce tabaka agar (TLA) yöntemi:

İnce tabaka agar yöntemi, ilaç içeren ve içermeyen katı besiyerlerine örneklerin inokülasyonunu takiben mikrokoloni oluşumunun mikroskopik olarak incelendiği bir direkt yöntemdir [7].

5. Faj temelli deneyler:

Bu yöntemde klinik örnekler ve kültürde canlı *M. tuberculosis* varlığını saptamak için bakteriyofajlar kullanılır [7].

Bu yöntemler 2009 yılında DSÖ tarafından değerlendirilmiştir. Yapılan bu değerlendirmede, TLA veya faj temelli deneylerin kullanımı için veriler yetersiz bulunmuşken; CRI yöntemleri, MODS ve NRA 'nın kullanımını destekleyen yeterli kanıt olduğuna kanaat getirilmiştir [7].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Malzeme ve Cihaz listesi

3.1.1. Cihazlar

1. Sınıf II biyogüvenlik kabini (HB 2448; Heraeus Instruments Hanau, Almanya)
2. BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD)
3. Hassas tartı
4. Buzdolabı
5. Otoklav
6. Vorteks
7. Soğutmalı santrifüj (Megafuge 1.0R; Heraeus Instruments Hanau, Almanya)
8. Etüv
9. Işık mikroskobu (CH-BI45-2; Olympus Life Science Hamburg, Almanya)
10. İnvert ışık mikroskobu (TMS; Nikon Co. Japonya)
11. Otomatik pipet (200 µl, 1000 µl)
12. Çok kanallı otomatik pipet (5-50 µl)

3.1.2. Malzemeler

Kimyasal malzemeler:

1. MGIT besiyeri ve supleman kiti (BD 245122 + BD245124; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD)
2. BBL Löwenstein-Jensen besiyeri (BD 221116; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD)
3. BD MGIT TBc Identifikasyon Testi (BD 245159; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD)
4. GenoType Mycobacterium CM/AS kiti (Hain LifeScience, Nehren)
5. Middlebrook 7H9 buyyon dehidrate baz (BD Difco 271310; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD)

6. Middlebrook OADC (BD 211886; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD)
7. İsoniazid (Sigma I3377 ; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD)
8. Rifampisin (Sigma R3501; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD)
9. Gliserol (Sigma G7893; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD)
10. Kasiton (Sigma T9410; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD)
11. PANTA (BD 245114; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD)
12. Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma D2650 ; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD)
13. NaOH kristalleri
14. Sodyum fosfat dibazik, anhidroz (Na_2HPO_4)
15. Potasyum fosfat monobazik, kristal (KH_2PO_4)
16. Tübekülosidal dezenfektan

Sarf malzemeler

1. Otomatik pipet ucu, filtreli (5-50 μl)
2. Otomatik pipet ucu, filtreli (100 -1000 μl)
3. Mikrosantrifüj tüpü (2 ml)
4. Şırınga tipi filtre (0,2 μm porlu)
5. Steril şırınga (1 ml, 10 ml)
6. Steril burğu kapaklı santrifüj tüpü (15 ml, 50 ml)
7. 24 kuyucuklu hücre kültür plağı (steril, kapaklı)
8. Santrifüj tüplerinin yerleştirileceği stant
9. Kilitli poşet
10. Eldiven
11. Maske

Çalışma kapsamında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na 01.04.2014 ile

01.09.2014 tarihleri arasında gelen ve rastgele seçilen 274 ve Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 01.09.2014 ile 15.12.2014 tarihleri arasında gelen preparat pozitif 57 olmak üzere toplam 331 balgam örneği incelenmiştir.

Çalışmanın tüm aşamaları sınıf II biyogüvenlik kabini içerisinde yapılmıştır. Kalite kontrol amacıyla *M. tuberculosis* H37Rv (tüm primer ilaçlara duyarlı suş), *M. tuberculosis* ATCC 35822 (INH'a dirençli suş) ve *M. tuberculosis* ATCC 35838 (RİF'e dirençli suş) standart suşları kullanılmıştır.

3.2. Örneklerin kabulü ve işlenmesi

Tek kullanımlık, steril, vidalı kapaklı balgam kaplarında gelen örnekler kabul edilmiştir. Tükürük içeriği fazla olan örnekler reddedilmiştir. Örnekler işleme alınana kadar buzdolabında (2-8 °C) bekletilmiştir [14,54].

Mikobakteri haricindeki bakterilerin dekontamine edilmesi ve örnekteki mukus ve organik kalıntıların sıvılaştırılması için balgam örnekleri dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu işlemlerden sonra mikobakterilerin izole edilme olasılığını arttırmak için konsantrasyon işlemi uygulanmıştır [14].

Dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi için balgam örneği 50 ml'lik steril, dibi konik polipropilen tüplere aktarıldıktan sonra eşit miktarda (1:1 oranında) %4'lük NaOH ile karıştırılmış, tüpün kapağı sıkıca kapatıldıktan sonra örnek sıvı hale gelene kadar (15-30 saniye) vortekslenmiştir. Sonrasında tüpler oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra, tüpün 45 ml işaret çizgisine kadar fosfat tamponu (pH 6,8) eklenerek dekontaminasyon işlemi sonlandırılmış ve nötralizasyon aşaması başlatılmıştır [14,54].

Dekontamine ve homojenize edilen örnekler 3000 x g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı dikkatlice tüberkülosidal dezenfektan içeren atık kutusuna dökülmüştür. Sedimentten steril öze ile 10 µl alınarak yayma preparat hazırlandıktan sonra üzerine toplam hacim 2,5 ml olacak şekilde fosfat tamponu (pH 6,8) eklenmiştir. Fosfat tamponu ile tekrar süspanse edilen sediment (balgam konsantratu) kültür işlemlerinde kullanılmıştır [14,54].

3.3. Aside dirençli boyama

Mikroskopik inceleme amacıyla her hasta örneği için 1 adet preparat hazırlanmıştır. Lam üzerinde 1 x 2 cm'lik dikdörtgen bir alana bir damla BOS buyyon damlatılmış ve sedimentten steril öze ile 10 µl alınarak dairesel hareketler ile alana yayılmıştır. Hazırlanan preparat oda sıcaklığında güvenlik kabini içerisinde kurumaya bırakılmıştır. Lamalar alevde tespit edilerek EZN yöntemiyle boyanmıştır [14,54].

EZN boyama: Lam karbolfuksin ile kaplanıp alttan yavaşça, kaynamayacak ancak duman çıkması sağlanana kadar (yaklaşık 3 dakika boyunca) ısıtılmış ve soğuduktan sonra boya su ile akıtılmış sonrasında % 3 asit alkolle (%3 HCl) dekolorize edildikten sonra tekrar su ile yıkanmıştır. Zıt boyama için lamın üzeri metilen mavisi ile kaplanmış ve 1 dakika beklendikten sonra su ile yıkanmıştır. Lam havada kurutulduktan sonra boyanan preparatlar x 100'lük objektifde (toplam 1000 kat büyütme) ışık mikroskobunda incelenmiştir [54].

EZN yöntemiyle boyanan preparatlar incelendikten sonra ARB sayısı aşağıdaki tabloya göre kantitatif olarak değerlendirilmiştir [14].

Tablo 3-1. Mikroskopik incelemede görülen ARB'lerin kantitatif olarak değerlendirilmesi.

Görülen ARB (ARB sayısı/inceleme alanı)	Sonuç
0	Negatif
1-2/300 alan	Şüpheli
1-9/100 alan	1+
1-9/10 alan	2+
1-9/1 alan	3+
>9/ 1 alan	4+

3.4. Kültür

Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemleri sonucunda hazırlanan balgam örnekleri LJ ve MGIT sistemi besiyerlerine ekilmiştir ve MODS yöntemiyle incelenmek üzere hücre kültür plaklarına inoküle edilmiştir. Bu bölümde LJ ve MGIT besiyerine yapılan ekimlerinden bahsedilmiştir MODS yöntemi ayrı bir başlık altında anlatılmıştır.

LJ kültürü

Hazırlanan konsantre balgamdan 1 ml'lik steril enjektör aracılığıyla 0,2 ml alınarak LJ besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan LJ besiyerleri 37 °C'de 1 gece yatık konumda bekletilmiş, ertesi gün dik konuma getirilerek 42 güne kadar 37°C'de

inkübe edilmiştir. LJ besiyerleri üreme açısından haftada bir kez makroskopik olarak kontrol edilmiştir. Üreme görülmesi halinde preparat hazırlanıp, EZN yöntemiyle boyanmış ve ARB varlığı yönünden incelenmiştir [54].

MGIT 960 sistemi ile kültür

MGIT 960 sisteminde, modifiye Middlebrook 7H9 buyyon içeren MGIT besiyerleri (7 ml) ile MGIT 960 supleman kiti kullanılmaktadır. MGIT besiyerleri ile birlikte verilen supleman kiti içerisinde, OADC içeren MGIT üreme desteği (15 ml) ve liyofilize halde polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin (PANTA) içeren BBL MGIT PANTA antibiyotik karışımı bulunmaktadır. MGIT üreme desteği şişesinden, steril enjektör aracılığı ile 15 ml alınarak BBL MGIT PANTA içerisine eklenmiş, bu karışımdan 0,8 ml alınarak MGIT besiyerlerine ilave edildikten sonra konsantre balgamdan 0,5 ml inoküle edilmiştir. Ekim yapılan MGIT besiyerleri üzerlerindeki barkod okutularak MGIT 960 cihazına yüklenmiştir. MGIT 960 cihazı içerisindeki besiyerleri 37 °C'de inkübe edilmektedir ve cihaz, içerisindeki foto dedektörleriyle floresan ışımaya seviyesini otomatik olarak 60 dakikada bir ölçerek üremeyi kontrol etmektedir. Üreme olduğunda, cihaz sesli uyarı vermekte ve üremenin olduğu (pozitif) besiyerlerinin yer aldığı çekmece üzerinde yer alan “+” işaretinin ışığı yanmaktadır. Üreme saptanan çekmece açılıp cihazın kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde pozitif besiyerleri çıkartılmış ve EZN yöntemi ile boyama yapılarak ARB varlığı kanıtlanmış ve üreyen bakterinin MTBC olduğunun teyit edilmesi için identifiye edilmiştir (Bkz. 3.4. İdentifikasyon). Cihaza yüklendikten sonra en az 42 gün boyunca üreme saptanmaması durumunda cihaz sesli uyarı vermekte ve üreme görülmeyen (negatif) besiyerlerinin yer aldığı çekmece üzerinde yer alan “-” işaretinin ışığı yanmaktadır. Negatif besiyerleri cihazın kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde çıkartılmış, makroskopik olarak incelendikten sonra üreme olmadığına kanaat getirilen besiyerleri otoklavlanıp atılmıştır [54-56].

3.5. İdentifikasyon

LJ besiyerinde üreyen kolonilerin morfolojileri makroskopik olarak ve kolonilerden hazırlanan preparatlar EZN yöntemiyle boyanarak mikroskopik olarak incelenmiştir (Bkz. 3.2. Aside dirençli boyama).

Pozitif MGIT besiyerleri makroskopik olarak incelenmiştir. Sıvı besiyerinde üreyen MTBC suşları granüller halinde görünmektedir ve bulanıklık oluşturmamaktadır.

Kontaminasyona neden olan mikroorganizmalar ise bulanıklık oluşturmaktadır. Besiyerleri makroskopik olarak incelenirken bu parametrelere dikkat edilmiştir. Besiyerinde üreyen mikroorganizmanın ARB olup olmadığının ve kord oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi için besiyerlerinden preparat hazırlanıp EZN yöntemiyle boyanmıştır. Kontaminasyon varlığının ya da yokluğunun belirlenmesi için ise kanlı agara ekim yapılmıştır. Ekim yapılan kanlı agar besiyerleri 37 °C’de 72 saat inkübe edilmiştir. EZN yöntemi ile boyanan preparatlar incelendiğinde, preparattaki ARB’lerin kordonlar şeklinde görünmesi durumunda mevcut mikobakteri suşunun kord faktör oluşturduğu kabul edilmiştir [54].

EZN preparatında aside dirençli bakteri görülmeyen ve 72 saatte kanlı agarda üremesi olan MGIT besiyerlerinde kontaminasyon olduğu kabul edilmiştir ve bu besiyerleri otoklavlanıp atılmıştır. EZN preparatında ARB/kord görülen ve/veya kanlı agarda üreme olmayan besiyerlerine BD MGIT TBc Identifikasyon Testi (TBc ID) uygulanmıştır [54].

MGIT besiyerinde pozitif sonuç alındıktan sonraki 10 gün içinde kültür örneklerine TBc ID deneyi uygulanmıştır. Oda sıcaklığına getirilmiş TBc ID test kartları deneyden hemen önce folyo torbasından çıkartılmış ve düz bir yüzeye yerleştirilmiştir. Test edilecek pozitif MGIT besiyeri tersine döndürülerek ve vortekslenerek iyice karıştırılmıştır. MGIT besiyerinden steril bir pipet ucu kullanılarak 100 µL alınmış ve uygun şekilde etiketlenmiş test kartının örnek kuyusuna (gözyaşı damlası ile gösterilen alan) konulmuştur. Zamanlayıcı 15 dakikaya kurulumu sonuc 15. dakikada okunmuş ve kaydedilmiştir [30].

TBc ID deneyi negatif çıkan örnekler tür tayini için GenoType Mycobacterium CM kiti ve gerekirse (GenoType Mycobacterium CM kiti ile sonuç alınamadığında) GenoType Mycobacterium AS kiti ile incelenmiştir.

3.6. MGIT 960 sistemi ile duyarlılık deneyi

MTBC olarak tanımlanmış suşların streptomisin, İNH, RİF ve etambutole duyarlılıkları üreme saptandıktan sonraki 5 gün içerisinde MGIT 960 SIRE (streptomisin, İNH, RİF, etambutol) kiti (SIRE kiti) kullanılarak MGIT 960 sistemi ile araştırılmıştır. MODS yönteminde sadece İNH ve RİF duyarlılığı araştırıldığından, çalışma kapsamında MGIT 960 sistemiyle yapılan antimikobakteriyel duyarlılık deneylerinin sadece İNH ve RİF’e ait sonuçları değerlendirmeye dahil edilmiştir.

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

SIRE kiti içerisinde liyofilize halde streptomisin, İNH, RİF ve etambutol bulunmaktadır. Liyofilize antibiyotik şişelerinin her birine 4 ml steril distile su eklenerek 83 µg/ml streptomisin, 8,3 µg/ml İNH, 83 µg/ ml RİF ve 415 µg/ml etambutol içeren antibiyotik solüsyonları elde edilmiştir [54,57].

Duyarlılık deneyi için MGIT besiyerlerinin hazırlanması:

Antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılığı araştırılacak her bir suş için 5 adet MGIT besiyeri kullanılmış, birinci besiyeri kontrol diğer besiyerleri test edilecek antibiyotikler olmak üzere uygun şekilde işaretlenmiştir. Aseptik koşullarda her bir besiyerine SIRE kiti içerisinden çıkan SIRE üreme desteğinden 0,8 ml eklenmiştir. Sonrasında her besiyerine ayrı ayrı hazırlanan antibiyotik solüsyonlarından aseptik koşullarda 100'er µl eklenmiş, kontrol besiyerine hiçbir antibiyotik eklenmemiştir [54,57].

İnokülumun hazırlanması:

Duyarlılık deneylerinde primer kültür kullanılmıştır. Duyarlılık deneyleri üreme saptandıktan sonraki 2 gün içerisinde yapılıyorsa pozitif sonuç veren MGIT besiyeri direkt kullanılmıştır. Duyarlılık deneyleri üreme saptandıktan sonraki 3-5. günde yapılıyorsa, pozitif MGIT besiyerinden 1 ml alınarak 4 ml steril fizyolojik tuzlu su içeren tüpe eklenip 1:5 oranında sulandırılmıştır [54,57].

Ekim işlemi ve MGIT besiyerlerinin cihaza yüklenmesi:

Pozitif MGIT besiyeri veya sulandırılmış (1:5 oranında) MGIT besiyeri iyice karıştırılmış ve her biri farklı antibiyotik içeren besiyerlerine 0,5'er ml inoküle edilmiştir. Besiyerleri 3-4 kere baş aşağı çevrilerek iyice karıştırılmıştır.

Kontrol besiyerinin hazırlanması için pozitif MGIT besiyeri veya sulandırılmış (1:5 oranında) MGIT besiyerinden 0,1 ml alınıp 10 ml steril fizyolojik tuzlu su içeren tüpe eklenerek süspansiyon 1:100 oranında sulandırılmıştır. Sulandırılmış (1:100 oranında) süspansiyondan 0,5 ml alınıp kontrol besiyerine eklenmiştir. Besiyeri 3-4 kere baş aşağı çevrilerek iyice karıştırılmıştır.

Besiyerleri barkodlu 5'li taşıyıcılara soldan sağa kontrol, streptomisin, İNH, RİF ve etambutol tüpleri olacak şekilde yerleştirilmiştir. Beşli taşıyıcı, üzerindeki barkod okutularak cihaza yerleştirilmiştir [54,57].

3.7. MODS yöntemi

Besiyeri stoğunun hazırlanması:

- Cam balon joje içerisinde 900 ml steril distile suya 3,1 ml gliserol ve 1,25 g kasiton ve 5,9 g Middlebrook 7H9 buyyon dehidrate baz eklenip tamamen çözülene kadar sürekli olarak karıştırılmıştır.
- 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.
- Soğuduktan sonra steril tüpler içine örneklerin hazırlanması için 4,5 ml, antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması için ise 10,8 ml olacak şekilde dağıtılmıştır.
- Besiyerleri, kontaminasyon kontrolü için 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir.
- Kullanılncaya kadar 2-8 °C'de saklanmış, bir ay sonunda kullanılmayan besiyerleri atılmıştır [58,59].

Not: Her bir balgam örneği için 4,5 ml 7H9 besiyeri kullanılmıştır.

Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması:

- İNH stok solüsyonu (8 mg/ml) 20 mg İNH 2,5 ml steril distile suda tamamen çözündürülerek hazırlanmış, por çapı 0,2 µm olan şırınga tipi filtre ile filtre edildikten sonra -20 °C'de 6 aya kadar saklanmıştır. RİF (8 mg/ml) stok solüsyonu için 20 mg RİF 1,25 ml DMSO içerisinde tamamen çözündürülmüş, üzerine 1,25 ml steril distile su eklenmiş ve por çapı 0,2 µm olan şırınga tipi filtre ile filtre edildikten sonra -20 °C'de 6 aya kadar saklanmıştır [58,59].

Çalışma solüsyonlarının hazırlanması:

Besiyeri çalışma solüsyonu:

- Saklanan solüsyonlardan işleme alınacak her bir balgam örneği için 1 tüp (4,5 ml) ve her bir plak için negatif kontrol sütünuna konulmak üzere ek olarak 1 tüp, pozitif kontrol için ise ek olarak 3 tüp 7H9 besiyeri kullanılmıştır.
- Antibiyotik solüsyonunun hazırlanması için ise 1-2 tüp 10,8 ml'lik 7H9 besiyeri kullanılmıştır.
- 4,5 ml 7H9 besiyeri içeren tüplere 0,5 ml OADC, 10,8 ml 7H9 besiyeri içeren tüplere ise 1,2 ml OADC eklenmiştir.
- Pozitif kontrol için 5 ml (4,5 ml besiyeri + 0,5 ml OADC) 7H9-OADC içeren 3 tüp ve antibiyotik solüsyonu hazırlanması için 12 ml (10,8 ml besiyeri+ 1,2 ml OADC) 7H9-OADC içeren tüpler ayrılmıştır.
- 5 ml 7H9-OADC içeren örnek tüpleri ve negatif kontrol tüplerine 0,1 ml PANTA eklenmiştir (7H9-OADC-PANTA, toplam hacim 5,1 ml).

Not: PANTA içeren besiyeri balgam örnekleri ve negatif kontroller için PANTA içermeyen besiyeri pozitif kontroller ve antibiyotik solüsyonu hazırlanması için kullanılmıştır [58,59].

Antibiyotik çalışma solüsyonlarının hazırlanması (Şekil.3-1):

Antibiyotik çalışma solüsyonları stok solüsyonlardan (8 mg/ml) çalışma gününde hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonlarının elde edilmesi için gerekli sulandırımalar 24 kuyucuklu mikropakta yapılmıştır. Bu plağın boş kalan sütunları pozitif kontrol amacıyla standart suşların inokülasyonunda kullanılmıştır.

Plağın 1C ve 1D kuyucuklarına 1'er ml 7H9-OADC besiyeri eklenmiştir.

Plağın 2. sütununa (2A, 2B, 2C ve 2D kuyucukları) 2'şer ml 7H9-OADC besiyeri eklenmiştir.

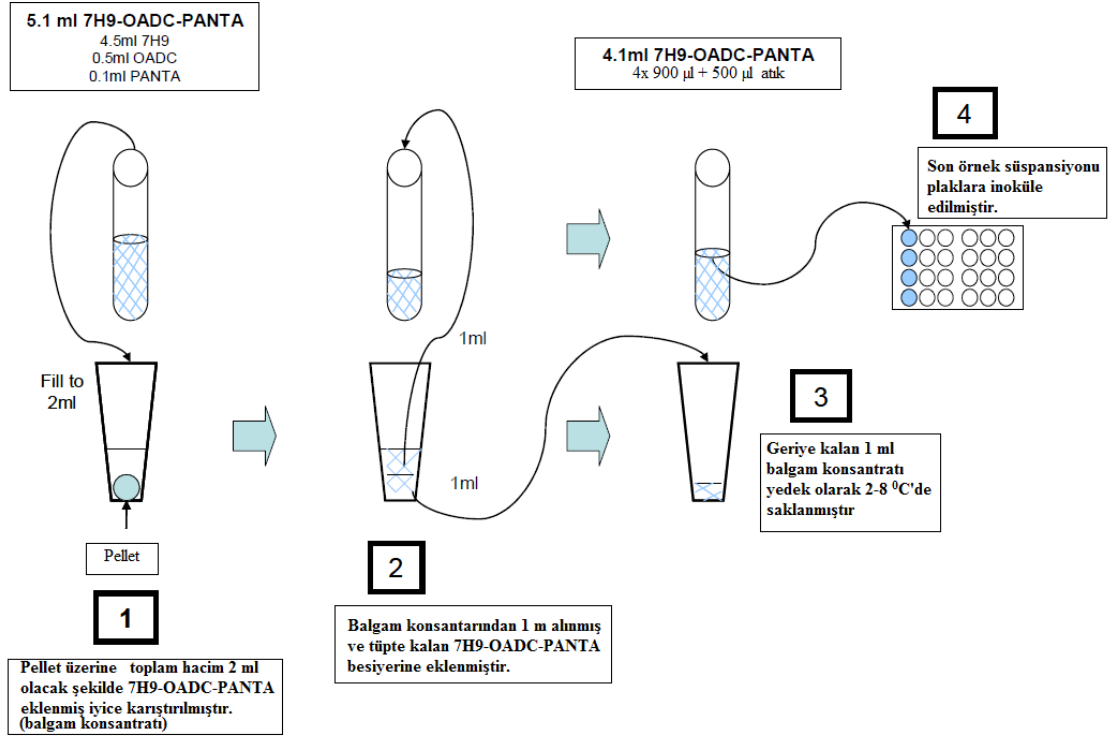
İNH stok solüsyonunun ekleneceği kuyucuktan (1C) 5 µl besiyeri çekilip atılmış, İNH stok solüsyonundan (8 mg/ml) 5 µl eklenmiş ve pipetleme yapılarak iyice karıştırılmıştır (40µg/ml İNH stok 2).

RİF stok solüsyonunun ekleneceği kuyucuktan (1D) 12,5 µl besiyeri çekilip atılmış, RİF stok solüsyonundan (8 mg/ml) 12,5 µl eklenmiş ve pipetleme yapılarak iyice karıştırılmıştır (100 µg/ml RİF stok 2)

Plağın 2C ve 2D kuyucuklarından 200 µl besiyeri çekilip atılmıştır.

Plağın 1C kuyucuğundan (40 µg/ml İNH stok 2) 200 µl alınıp 1800 µl besiyeri içeren 2C kuyucuğuna eklenmiş ve pipetleme yapılarak iyice karıştırılmıştır (4µg/ml İNH çalışma solüsyonu)

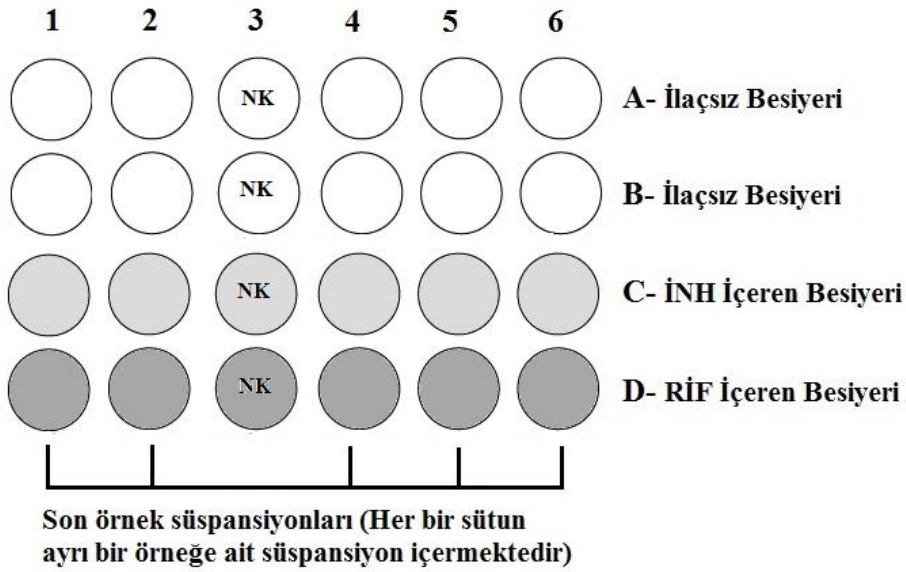
Plağın 1D kuyucuğundan (100 µg/ml RİF stok 2) 200 µl alınıp 1800 µl besiyeri içeren 2C kuyucuğuna eklenmiş ve pipetleme yapılarak iyice karıştırılmıştır (10 µg/ml RİF çalışma solüsyonu) [58,59].



Şekil 3-2. Son örnek süspansiyonlarının hazırlanması

Örnek süspansiyonlarının plaklara inokülasyonu:

- Her bir örnek için 24 kuyucuklu plağın bir sütunu kullanılmıştır. Sütundaki her kuyucuğa 900 µl son örnek süspansiyonun ilave edilmiştir.
- Üçüncü sütun hariç tüm sütunlara örnek süspansiyonlarından ilave edilmiştir.
- Üçüncü sütuna örnek süspansiyonlarından eklenmemiş 7H9-OADC-PANTA besiyerinden 900 µl koyulmuştur, bu sütun negatif kontrol olarak kullanılmıştır.
- Plağın kapağı kapatıldıktan sonra kilitli poşete alınmış ve 37 °C'de inkübe edilmiştir [58,59].



Şekil 3-3. Plaklardaki kuyucukların içeriği.

İNH: İsoniazid, NK: Negatif kontrol, RİF: Rifampisin.

Pozitif kontrol suşlarının plaklara inokülasyonu:

- Pozitif kontrol olarak kullanılacak standart suşların (Bkz. Kalite kontrol) taze pasajlarından McFarland 1'e eş değer bulanıklıkta süspansiyonlar hazırlanmıştır.
- Her bir standart suş için hazırlanan süspansiyonlardan 5'er µl alınarak 5 ml 7H9-OADC besiyerine eklenmiştir.
- Çapraz kontaminasyonun önlenmesi için pozitif kontrol süspansiyonları ayrı bir plağa inoküle edilmiştir.
- Pozitif kontrol süspansiyonları, antibiyotik dilüsyon plağının boş sütunlarına inoküle edilmiştir.
- Örnek süspansiyonlarıyla aynı şekilde, her bir kontrol suşu için bir sütun kullanılmış, sütunun 4 kuyucuğuna pozitif kontrol süspaniyonundan 900 µl eklenmiştir.
- Plağın kapağı kapatıldıktan sonra kilitli poşete alınmış ve 37 °C'de inkübe edilmiştir [58,59].

Plakların değerlendirilmesi:

- Plaklar 5. günde incelenmeye başlanmıştır.

Not: Erken mikobakteri üremesi küçük, kıvrık virgül veya spiral (5-9. günler) şeklinde görülmekte, sonrasında kord oluşumu gözlenmektedir.

- Beşinci günde üreme görülemeyen plaklar 14. güne kadar hergün veya gün aşırı incelenmiştir. 14. günden sonra, 15-21. günler arasında inceleme 2-3 günde bir yapılmıştır. Plaklar invert mikroskopta 10x'luk objektif ile incelenmiştir [58,59].

- Her iki ilaç içermeyen kuyucukta 2 veya daha fazla cfu görülmesi, pozitif kültür olarak tanımlanmıştır.
- İlaç içermeyen kuyucukların sadece birinde üreme görülmesi veya her iki kuyucukta sadece 1 cfu görülmesi durumunda sonuç belirsiz olarak kabul edilmiş ve yedek örneklerden tekrar çalışılmıştır.
- Kültürün ilaç içermeyen 2 kuyucukta da pozitif olduğu gün, ilaç içeren kuyucuklar da incelenmiştir.
- İlaç içeren kuyucuklarda 2 veya daha fazla cfu görülmesi, suşun o ilaca karşı dirençli olduğunu göstermiştir.
- Bakteri veya mantarlarla kontaminasyon söz konusu olduğunda, yedek örneklerden tekrar çalışılmıştır.
- Yirmi birinci güne kadar üreme görülmemesi negatif kültür olarak tanımlanmıştır.
- Yirmi bir günün sonunda plaklar otoklavda steril edilip atılmıştır.

MODS yönteminde ek identifikasyon deneyleri yapılmamıştır, invert mikroskopta kord oluşumu gözlenen örnekler MTBC varlığı açısından pozitif olarak kaydedilmiştir [58,59].

Tablo 3-2. MODS yönteminde kültür sonuçlarının değerlendirilmesi

A kuyucuğu	B kuyucuğu	Sonuç
+	+	Pozitif
-	-	Negatif
+	K	Kontamine
K	+	Kontamine
-	K	Kontamine
K	-	Kontamine
K	K	Kontamine
+/-	K	Kontamine
K	+/-	Kontamine
+	-	Belirsiz
-	+	Belirsiz
+	+/-	Belirsiz
+/-	+	Belirsiz
-	+/-	Belirsiz
+/-	-	Belirsiz
+/-	+/-	Belirsiz
+: kuyucukta ≥ 2 cfu		+/-: kuyucukta 1 cfu
-: kuyucukta üreme yok		K: Mikobakteri üremesi yok ve kontaminasyon var

Tablo 3-3. MODS yönteminde duyarlılık deneyi sonuçlarının değerlendirilmesi.

C kuyucuğu 0,4 µg/ml İNH	D kuyucuğu 1,0 µg/ml RİF	Sonuç
+	+	ÇİD
-	-	İNH'a ve RİF'e duyarlı
+	-	İNH'a dirençli RİF'e duyarlı
+	K	İNH'a dirençli RİF duyarlılığı belirsiz
+	+/-	İNH'a dirençli RİF duyarlılığı belirsiz
-	+	İNH'a duyarlı RİF'e dirençli
K	+	İNH'a duyarlılığı belirsiz RİF'e dirençli
+/-	+	İNH'a duyarlılığı belirsiz RİF'e dirençli

+: kuyucukta ≥ 2 cfu; -: kuyucukta üreme yok; +/-: kuyucukta 1 cfu; ÇİD: çok ilaca dirençli; İNH: isoniazid; K: Mikobakteri üremesi yok ve kontaminasyon var; RİF: rifampisin

Kalite kontrolü:

- Her plakta negatif kontrol bulunmaktadır. Negatif kontrol sütununda herhangi bir koloni bulunması kontaminasyon olarak nitelendirilmiş ve tüm plak atılıp örnekler yeniden çalışılmıştır.
- Pozitif kontroller ayrı bir plakta yer almaktadır. Sütunlardan birine tamamen duyarlı standart *M. tuberculosis* H37Rv suşu, diğer sütunlara İNH'a dirençli *M. tuberculosis* ATCC 35822 suşu ve RİF'e dirençli *M. tuberculosis* ATCC 35838 suşu inoküle edilmiştir.
- İlaç içermeyen besiyerlerinde tüm suşların üremesi gerekmektedir. İlaç konsantrasyonlarının doğru olduğu İNH veya RİF içeren besiyerinde duyarlı suşun ürememesi, fakat İNH'a dirençli suşun İNH, RİF'e dirençli suşun ise RİF kuyucuklarında üremesiyle anlaşılmıştır.
- Pozitif kontrol suşlarının beklendiği şekilde ürememesi durumunda, aynı gün hazırlanan tüm plaklar tekrarlanmıştır [58,59].

3.8. Sonuçların elde edilme sürelerinin belirlenmesi

MGIT sistemiyle kültür pozitifliği süresi örneklerin ekildiği MGIT besiyerlerinin cihaza yüklenmesinden, cihazın besiyerlerinde üreme saptadığı güne kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır. Üreme saptandıktan sonra yapılan identifikasyon testlerinin sonuçlanma süresi kültür pozitifliği süresine eklenmemiştir. MGIT sistemiyle yapılan indirekt duyarlılık deneyi süresi, üreyen suşun kontrol ve test edilen antimikobakteriyel ilaçları içeren MGIT besiyerlerine ekilip cihaza yüklenmesinden cihazın duyarlılık sonucunu çıkartmasına kadar geçen süre olarak

tanımlanmıştır. MGIT sistemiyle ilaçlara duyarlılık sonucunun elde edilme süresi, kültür pozitifliği süresine duyarlılık deneyi süresi eklenerek hesaplanmıştır.

LJ kültüründe kültür pozitifliği süresi, örneklerin LJ besiyerine ekilmesinden haftalık olarak yapılan makroskopik incelemede besiyerinde üreme saptanmasına kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır.

MODS yönteminde kültür pozitifliği süresi, örneklerin hücre kültür plaklarına ekilmesinden invert mikroskopta kord oluşturarak üreyen (ya da erken safhalarda küçük, kıvrık virgül veya spiral şeklinde üreyen) mikroorganizmaların gözlenmesine kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır. Plaklar 5. günden itibaren okunmaya başlandığından MODS yöntemiyle kültür sonucunun 5. günden önce elde edilme ihtimali bulunmamaktadır. MODS yönteminde ilaçsız besiyeri içeren kuyucuklarda üreme görüldüğü gün, İNH ve RİF eklenmiş kuyucuklar da incelenmiş ve böylelikle kültür sonucu ile ilaçlara duyarlılık sonucu eş zamanlı olarak elde edilmiştir.

3.9. İstatistiksel analiz

Çalışmanın biyoistatistiksel çözümlemesinde, ele alınan ölçütler medyan, ortalama, standart sapma, frekans ve yüzde değerleri ile tanımlanmıştır.

Gruplar arası frekans ve yüzdelerin kıyaslanmasında Ki-kare ve Fisher kesin olasılık testi kullanılmıştır.

Tanı uyumlarını denetlemek için, iki yöntemin uyum düzeyinin değerlendirmesinde kappa katsayısı, bağıntı irdelemesi için ise kendall tau-b katsayısı kullanılmıştır.

Normal dağılıma sahip değişken ortalamalarının karşılaştırılması için, iki grup kıyaslamasında t testi kullanılmıştır.

Gerekli ise (denek sayısı ve homojenlik denetlemesine bağlı olarak) bağımsız iki grup kıyaslaması için nonparametrik “Mann-Whitney U” ve bağımlı iki grup kıyaslaması için “Wilcoxon testi” yöntemleri uygun deney kurgularında kullanılmıştır.

Yorumlamalarda anlamlılık sınırı $p=0.05$ alınmıştır.

Biyoistatistiksel analizlerde SPSS (Sürüm:17.5) paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamında incelenen 331 balgam örneğinin 241 hastaya ait olduğu belirlenmiştir. Balgam örneklerinden yapılan preparatlarda 331 örneğin 74'ünün ARB pozitif (%22,36), 257'sinin ARB negatif (%77,64) olduğu bulunmuştur.

4.1. Kültür sonuçları

ARB pozitif 74 örneğin 70'inde (%94,59) ve ARB negatif 257 örneğin dokuzunda (%3,5) olmak üzere toplam 331 örneğin 79'unda (%23,87) kültür yöntemlerinden en az biriyle mikobakteri varlığı saptanmıştır. ARB pozitif örneklerin birinde ve ARB negatif örneklerin 14'ünde olmak üzere, toplam 331 örneğin 15'inde (%4,53) sıvı kültür yöntemlerinden en az birinde kontaminasyon saptanmıştır.

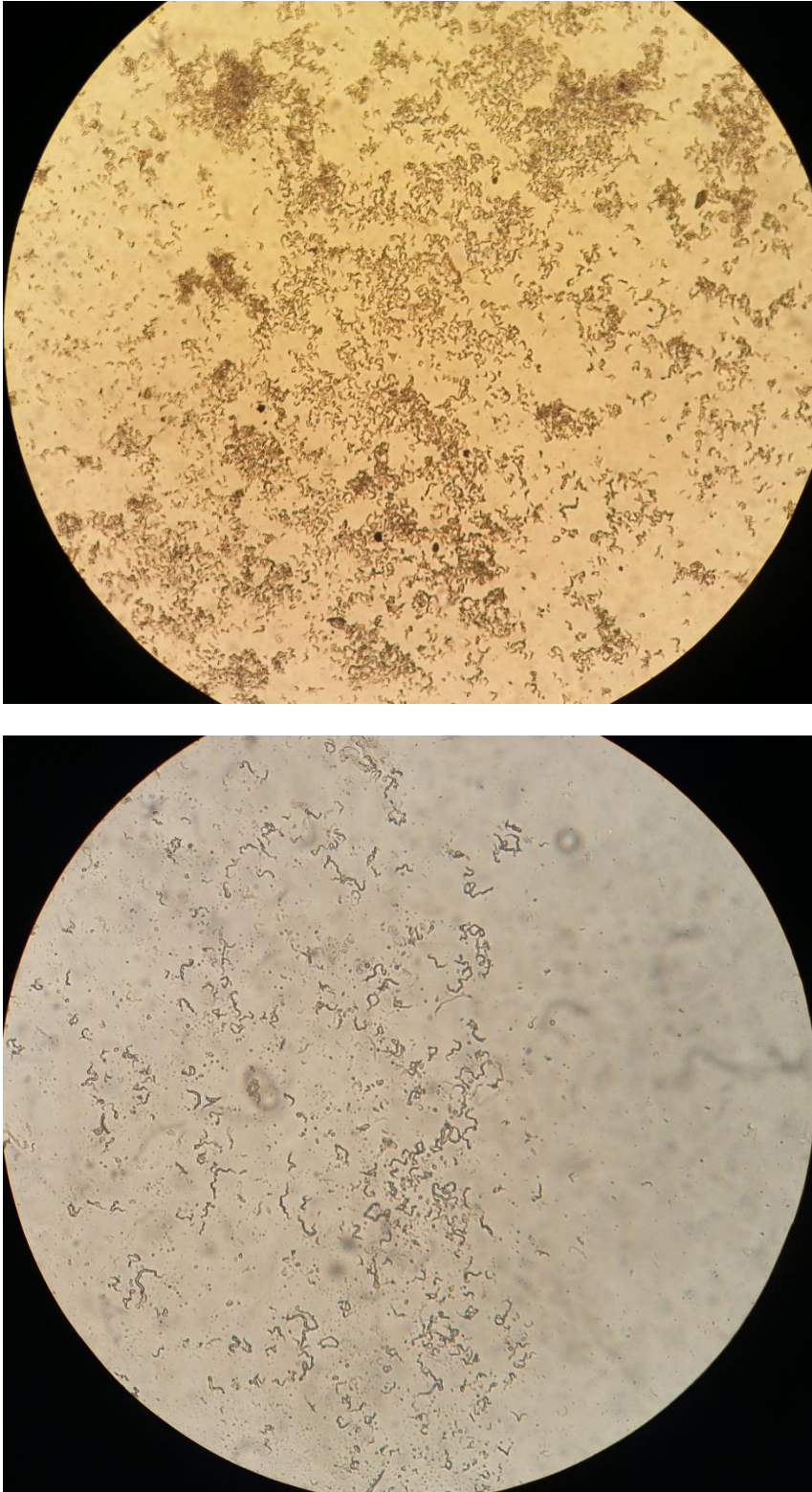
MGIT 960 sistemi ile, ARB pozitif 74 örneğin 70'inde (%94,59) ve ARB negatif 257 örneğin dokuzunda (%3,5) olmak üzere toplam 331 örneğin 79'undan (%23,87) pozitif sonuç alınmıştır (Tablo 4-1). Tümü ARB negatif örneklerde olmak üzere incelenen 331 örneğin dokuzunda (%2,72) MGIT kültüründe kontaminasyon saptanmıştır.

ARB pozitif 74 örneğin 63'ünde (%85,14) ve ARB negatif 257 örneğin beşinde (%1,95) olmak üzere toplam 331 örneğin 68'inde (%20,54) LJ kültürü pozitif bulunmuştur (Tablo 4-1).

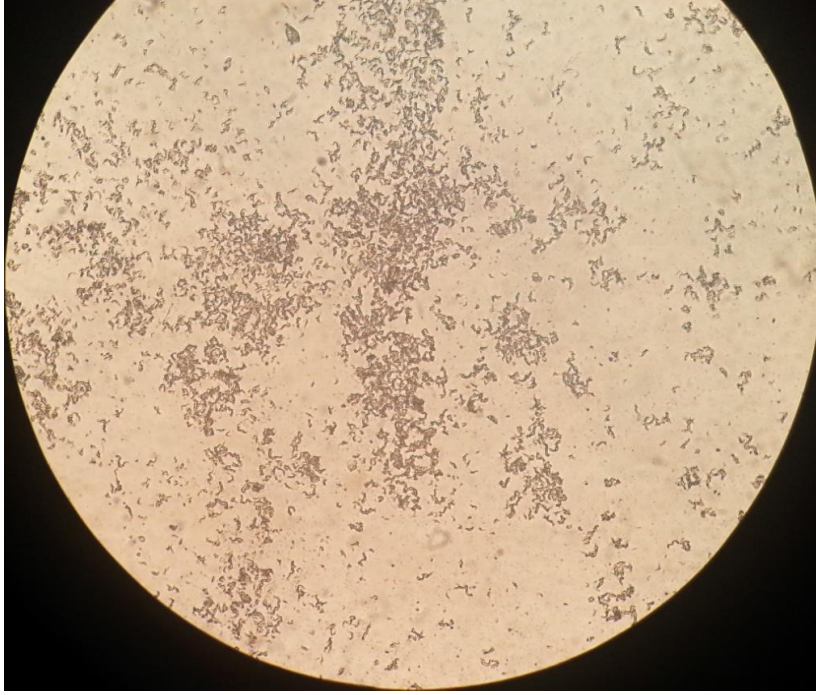
MODS yöntemi ile, ARB pozitif 74 örneğin 69'unda (%93,24) ve ARB negatif 257 örneğin beşinde (%1,95) olmak üzere toplam 331 örneğin 74'ünde (%22,36) MODS kültürü pozitif bulunmuştur (Tablo 4-1). MODS yönteminde, biri ARB pozitif, sekizi ARB negatif örneklerde olmak üzere incelenen 331 örneğin dokuzunda (%2,72) kontaminasyon saptanmıştır. MODS yönteminde, invert mikroskop ile yapılan incelemelerde, erken safhalarda (5-9. gün) küçük, kıvrık virgül veya spiral şeklinde, ileri safhalarda (>9. gün) kord oluşturarak üreyen mikroorganizmalar şekil 4-1-4-7'de görülmektedir.

Tablo 4-1. ARB pozitif ve negatif örneklerde kültür sonuçlarının dağılımı

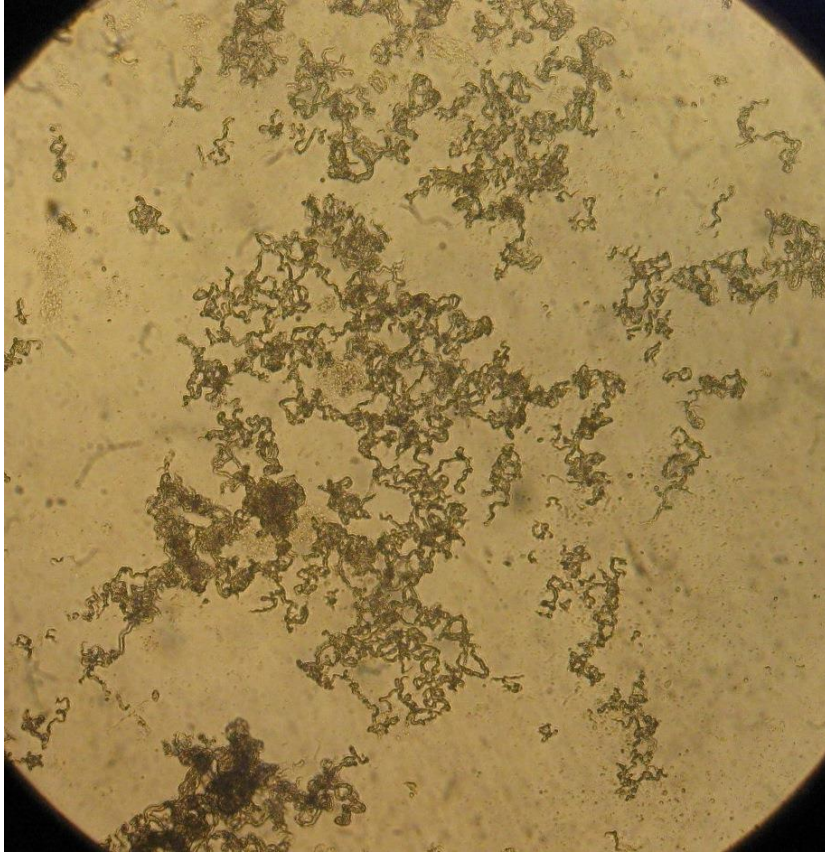
	MGIT (+)	MGIT (-)	LJ (+)	LJ (-)	MODS (+)	MODS (-)	Toplam
ARB (+)	70	4	63	11	69	5	74
ARB (-)	9	248	5	252	5	252	257
Toplam	79	252	68	263	74	257	331



Şekil 4-1. İki farklı örnekten yapılan (her bir resim ayrı bir örnek) MODS kültürünün yedinci gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).



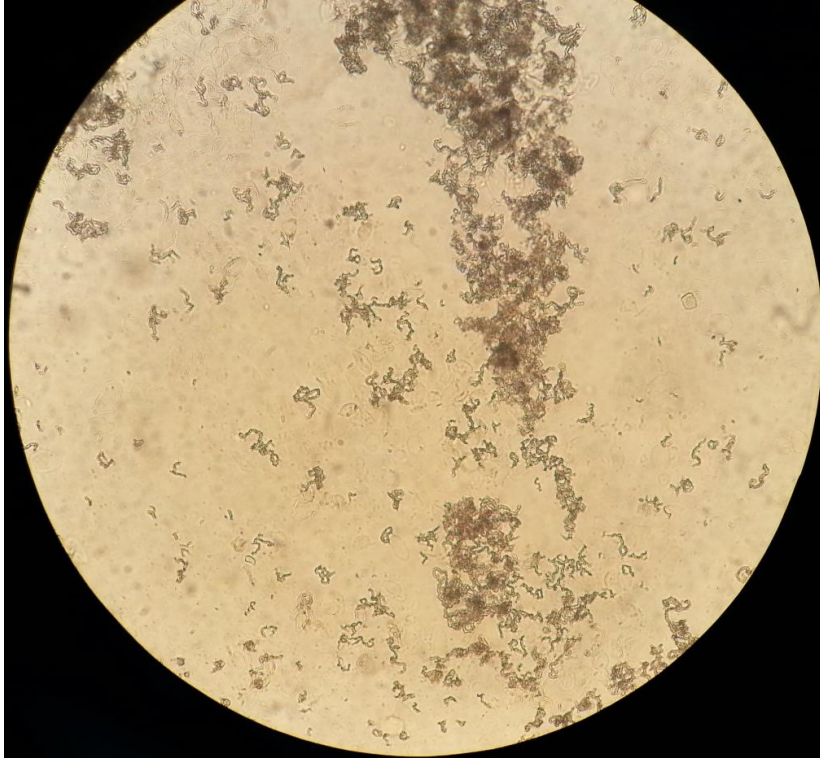
Şekil 4-2. MODS kültürünün sekizinci gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).



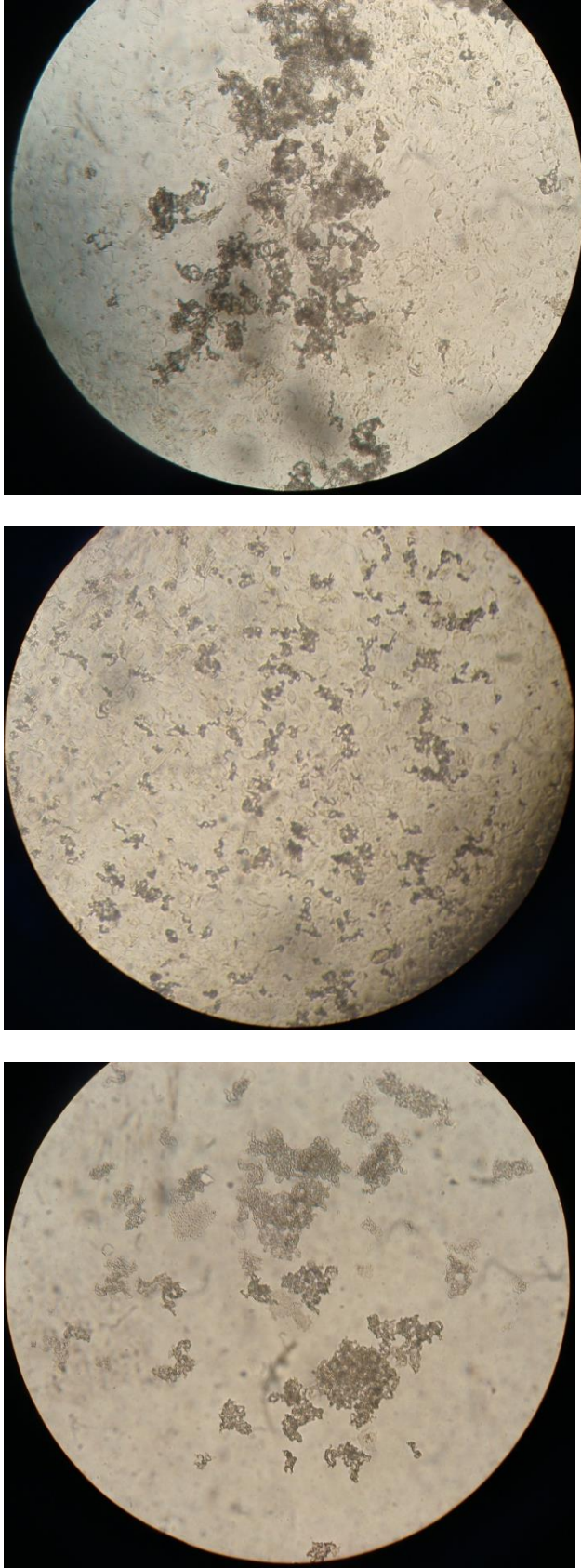
Şekil 4-3. MODS kültürünün dokuzuncu gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).



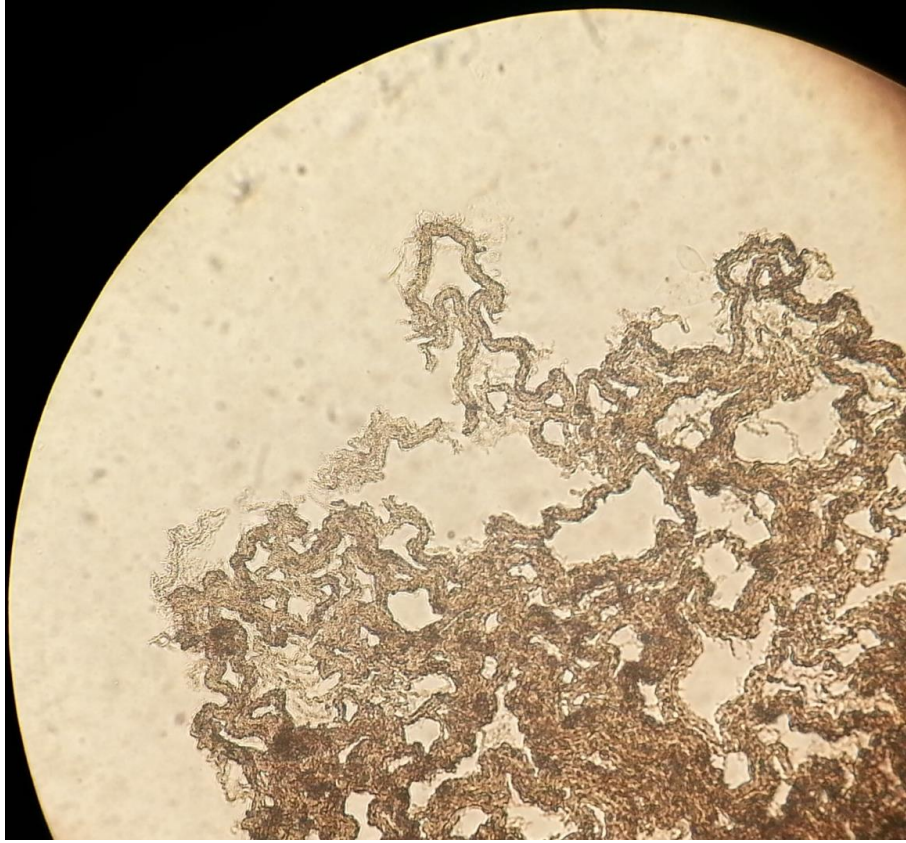
Şekil 4-4. MODS kültürünün 10. gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).



Şekil 4-5. MODS kültürünün 11. gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).



Şekil 4-6. Üç farklı örnekten yapılan (her bir resim ayrı bir örnek)MODS kültürünün 14. gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).



Şekil 4-7. MODS kültürünün 21. gününde MTBC kolonilerinin invert mikroskopta görünümü (x100 büyütme).

Tüm kültür yöntemleri bir arada değerlendirildiğinde, preparatı ve kültürü pozitif olan 70 örnekten izole edilen mikobakteri suşlarının 69'unun (%98,57) MTBC, birinin (%1,43) TDM olduğu bulunmuştur. GenoType Mycobacterium CM deneyi ile üreyen TDM *M. abscessus* olarak tanımlanmıştır. Preparatı negatif ancak kültürü pozitif olan dokuz örnekten izole edilen mikobakteri suşlarının beşinin (%55,56) MTBC, dördünün (%44,44) TDM olduğu belirlenmiştir. GenoType Mycobacterium CM deneyi ile TDM'lerin birinin *M. fortuitum*, ikisinin *M. abscessus* olduğu belirlenmiş, birinin türü saptanamamıştır. Türü saptanamayan suş için GenoType Mycobacterium AS deneyi uygulanmış bu deney ile de türü saptanamamıştır (*Mycobacterium spp.* olarak belirtilmiştir). Sonuç olarak 69'u ARB pozitif ve beşi ARB negatif örneklerde olmak üzere toplamda 331 örneğin 74'ünde (%22,36) MTBC, 1'i ARB pozitif ve dördü ARB negatif örneklerde olmak üzere toplamda 331 örneğin beşinde (%1,51) TDM varlığı saptanmıştır (Tablo 4-2).

Tablo 4-2. ARB pozitif ve negatif örneklerden izole edilen mikobakterilerin dağılımı

	MTBC	TDM	Toplam
ARB (+)	69	1	70
ARB (-)	5	4	9
Toplam	74	5	79

Tek başına MGIT kültürü değerlendirildiğinde, preparat ve kültür pozitif bulunan, 70 örneğin 69'unda (%98,57) üreyen mikobakterinin MTBC (Tablo 4-3), birinde (%1,43) TDM (*M. abscessus*) olduğu bulunmuştur. Preparatı negatif ancak, kültürü pozitif dokuz örneğin beşinde (%55,56) üreyen mikobakterinin MTBC (Tablo 4-4), dördünde (%44,44) TDM (biri *M. fortuitum*, ikisi *M. abscessus*, biri *Mycobacterium spp.*) olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak MGIT kültürü ile 69'u ARB pozitif ve beşi ARB negatif örneklerde olmak üzere toplamda 331 örneğin 74'ünde (%22,36) MTBC (Tablo 4-5); biri ARB pozitif ve dördü ARB negatif örneklerde olmak üzere toplamda 331 örneğin beşinde (%1,51) TDM varlığı saptanmıştır.

Tablo 4-3. ARB pozitif balgam örneklerinde MGIT kültürü sonuçları

ARB pozitif	MTBC (+)	MTBC (-)	Toplam
MGIT (+)	69	1	70
MGIT (-)	0	4	4
Toplam	69	5	74

Tablo 4-4. ARB negatif balgam örneklerinde MGIT kültürü sonuçları

ARB negatif	MTBC (+)	MTBC (-)	Toplam
MGIT (+)	5	4	9
MGIT (-)	0	248	248
Toplam	5	252	257

Tablo 4-5. Tüm balgam örneklerinde MGIT kültürü sonuçları

	MTBC (+)	MTBC (-)	Toplam
MGIT (+)	74	5	79
MGIT (-)	0	252	252
Toplam	74	257	331

Tek başına LJ kültürü değerlendirildiğinde preparatı ve kültürü pozitif bulunan 63 örneğin 62'sinde (%98,41) MTBC (Tablo 4-6), birinde (%1,59) TDM (*M. abscessus*) ürettiği belirlenmiştir. Preparatı negatif ancak kültürü pozitif bulunan beş örneğin ikisinde (%40) MTBC (Tablo 4-7), üçünde (%60) TDM (ikisi *M. abscessus*, biri *M. fortuitum*) ürettiği belirlenmiştir. Sonuç olarak LJ kültürü ile 62'si ARB pozitif ve ikisi ARB negatif örneklerde olmak üzere toplamda 331 örneğin 64'ünde (%19,34) MTBC (Tablo 4-8), biri ARB pozitif ve üçü ARB negatif örneklerde olmak üzere toplamda 331 örneğin dördünde (%1,21) TDM varlığı saptanmıştır.

Tablo 4-6. ARB pozitif balgam örneklerinde LJ kültürü sonuçları

ARB pozitif	MTBC (+)	MTBC (-)	Toplam
LJ (+)	62	1	63
LJ (-)	7	4	11
Toplam	69	5	74

Tablo 4-7. ARB negatif balgam örneklerinde LJ kültürü sonuçları

ARB negatif	MTBC (+)	MTBC (-)	Toplam
LJ (+)	2	3	5
LJ (-)	3	249	252
Toplam	5	252	257

Tablo 4-8. Tüm balgam örneklerinde LJ kültürü sonuçları

	MTBC (+)	MTBC (-)	Toplam
LJ (+)	64	4	68
LJ (-)	10	253	263
Toplam	74	257	331

Tek başına MODS yöntemi değerlendirildiğinde, preparatı ve kültürü pozitif bulunan, 69 örneğin 68'inde (%98,55) MTBC (Tablo 4-9), birinde (%1,45) TDM (*M. abscessus*) ürettiği belirlenmiştir. Preparatı negatif ancak kültürü pozitif bulunan beş örneğin üçünde (%60) MTBC (Tablo 4-10) , ikisinde (%40) TDM (ikisi de *M. abscessus*) ürettiği belirlenmiştir. Sonuç olarak MODS yöntemi ile 68'i ARB pozitif ve üçü ARB negatif örneklerde olmak üzere toplamda 331 örneğin 71'inde (%21,45) MTBC (Tablo 4-11), biri ARB pozitif ve ikisi ARB negatif örneklerde olmak üzere

toplamda 331 örneğin üçünde (%0,91) üreyen mikobakterinin TDM olduğu saptanmıştır.

Tablo 4-9. ARB pozitif balgam örneklerinde MODS kültürü sonuçları

ARB pozitif	MTBC (+)	MTBC (-)	Toplam
MODS (+)	68	1	69
MODS (-)	1	4	5
Toplam	69	5	74

Tablo 4-10. ARB negatif balgam örneklerinde MODS kültürü sonuçları

ARB negatif	MTBC (+)	MTBC (-)	Toplam
MODS (+)	3	2	5
MODS (-)	2	250	252
Toplam	5	252	257

Tablo 4-11. Tüm balgam örneklerinde MODS kültürü sonuçları

	MTBC (+)	MTBC (-)	Toplam
MODS (+)	71	3	74
MODS (-)	3	254	257
Toplam	74	257	331

MGIT 960 sistemiyle MTBC varlığı saptanan 74 örneğin üçünde (%4,05) (biri ARB pozitif, ikisi ARB negatif örnek) MODS yöntemiyle MTBC varlığı saptanamamıştır ancak bu örneklerin ait olduğu hastaların diğer balgam örneklerinde MODS yöntemiyle MTBC varlığı saptanmıştır. MODS yöntemiyle MTBC varlığı saptanamayan ARB negatif iki örnekten biri MGIT cihazında 21. günde, diğeri 30. günde üremiştir. Ayrıca pozitif MGIT besiyerinden yapılan preparatta kord varlığı görülememiştir. Bu iki örnekte MODS yöntemiyle MTBC varlığının saptanamamasının nedeni, örnekte çok az sayıda mikobakteri bulunması ve MODS kültürünün 21 günlük inceleme süresi boyunca kord oluşmaması şeklinde değerlendirilmiştir. Bu bulgu, 21 günden daha fazla sürede üreyen mikobakterilerin bu yöntemle saptanamayacağını ortaya çıkarmıştır.

MODS yöntemiyle pozitif olarak kaydedilen 74 örneğin üçünde (%4,05) üreyen mikobakterinin TDM (*M. abscessus*) olduğu belirlenmiştir. Bu örneklerin pozitif MGIT besiyerlerinden yapılan preparatlarında da kord varlığı gözlenmiştir. Bu bulgu MODS kültürü ile TB'nin mikrobiyolojik tanısında kord oluşturan TDM'lerin yalancı pozitifliğe yol açabileceğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak MODS yöntemiyle incelenen 331 balgam örneğinden üçünde (%0,91) yalancı negatif ve üçünde (%0,91) yalancı pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu veriler ışığında balgam örneklerinden MTBC varlığını saptamada MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif tahmin ettirici değeri (PPV) ve negatif tahmin ettirici değeri (NPV) sırasıyla %95,95, %98,83, %95,95, ve %98,83 olarak bulunmuştur. Referans yöntem ile karşılaştırıldığında MODS yönteminin tanısal doğruluğunun %98,19 (kappa değeri 0,948) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-12).

Tablo 4-12. Balgam örneklerinden MTBC'nin izole edilmesinde MODS yönteminin değeri

Duyarlılık (%95 GA)	Özgüllük (%95 GA)	PPV (%95 GA)	NPV (%95 GA)	Doğruluk (%95 GA)
%95,95 (91,5-100)	%98,83 (97,5-100)	%95,95 (91,5-100)	%98,83 (97,5-100)	%98,19 (96,75-99,62)

Preparat sonuçlarına (ARB pozitif veya negatif) göre MODS kültürünün duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si değerlendirildiğinde, ARB pozitif örneklerde MODS yönteminin duyarlılığı ve PPV'sinin %98,55'e yükseldiği, özgüllüğü ve NPV'sinin %80,00'e düştüğü belirlenmiş; ARB negatif örneklerde ise duyarlılığı ve PPV'sinin %60,00'a düştüğü, özgüllüğü ve NPV'sinin ise %99,21'e yükseldiği bulunmuştur. MODS yönteminin tanısal doğruluğu değerlendirildiğinde ARB pozitif örneklerde hafif bir düşüş (%97,30, kappa değeri 0,786), ARB negatif örneklerde ise hafif bir yükselme (%98,44, kappa değeri 0,592) gözlenmiştir (Tablo 4-13). Bununla birlikte çalışmada, ARB pozitif örneklerde sadece bir örnekte yalancı pozitif sonuç alınmasına rağmen yöntemin özgüllüğü ve NPV'sinde; ARB negatif örneklerde sadece iki örnekte yalancı negatif sonuç alınmasına rağmen yöntemin duyarlılığı ve PPV'sinde belirgin ölçüde azalma görülmesi ARB pozitif örneklerde kültür negatifliği oranının (referans yöntem MGIT 960 sistemi ile %6,75); ARB negatif örneklerde ise kültür pozitifliği oranının (referans yöntem MGIT 960 sistemi ile % 1,95) düşük olmasıyla açıklanabilir. Bu nedenle ARB pozitif örneklerde yöntemin özgüllüğü ve NPV'sinin,

ARB negatif örneklerde ise yöntemin duyarlılığı ve PPV'sinin daha fazla örnekle çalışıldığında değerlendirilmesi uygun bulunmuştur.

Tablo 4-13. ARB pozitif ve ARB negatif balgam örneklerinde MODS yönteminin değeri

	ARB pozitif	ARB negatif
Duyarlılık (%95 GA)	%98,55 (95,7-100)	%60,00 (17,1-100)
Özgüllük (%95 GA)	%80,00 (44,9-100)	%99,21 (98,1-100)
PPV (%95 GA)	%98,55 (95,7-100)	%60,00 (17,1-100)
NPV (%95 GA)	%80,00 (44,9-100)	%99,21 (98,1-100)
Doğruluk (%95 GA)	%97,30 (93,6-100)	%98,44 (96,93-99,96)

4.2. Duyarlılık sonuçları

MGIT 960 sistemiyle 79 örnekte kültür sonucu pozitif bulunmuş, 79 örneğin 74'ünde MTBC ürettiği saptanmıştır. MGIT 960 sistemiyle 74 MTBC suşunun antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılıkları araştırılmış ve 74 suşun 31'inin (%41,89) İNH'a, 14'ünün (%18,92) RİF'e ve 13'ünün (%17,57) hem İNH'a hem de RİF'e (ÇİD) dirençli olduğu saptanmıştır (Tablo 4-14).

MODS yöntemiyle 74 örnekte kültür sonucu pozitif bulunmuştur, 74 örneğin 71'inde MTBC ürettiği belirlenmiştir. MODS yöntemiyle saptanan 71 MTBC suşunun antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılıkları incelenmiş ve 27'sinin (%38,03) İNH'a, 14'ünün (%19,72) RİF'e ve 14'ünün (%19,72) her iki ilaca da dirençli (ÇİD) olduğu saptanmıştır (Tablo 4-16).

Tablo 4-14. MGIT ve MODS yöntemiyle izole edilen MTBC suşlarının duyarlılık sonuçları

	İNH-S	İNH-R	RİF-S	RİF-R	ÇİD (-)	ÇİD (+)
MGIT (n=74)	43	31	60	14	61	13
MODS (n=71)	44	27	57	14	57	14

R: dirençli, S: duyarlı

MODS yöntemiyle kültür sonucu pozitif bulunan 74 örneğin üçünde TDM (*M. abscessus*) ürettiği belirlenmiş ve bu üç suşun üçü de bu yöntemle ÇİD olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle çalışmada MODS yönteminin mutlaka bir identifikasyon yöntemiyle kombine edilmesi gerektiği de saptanmıştır.

MTBC varlığının hem MODS yöntemiyle hem de MGIT sistemiyle saptandığı örneklerde (n=71) üreyen suşların ilaçlara duyarlılık sonuçları karşılaştırılmıştır.

İlaç duyarlılık deneylerinde denenen mikroorganizmanın aslında “dirençli” olduğu bir ilaca “duyarlı” olarak bildirilmesi “çok büyük hata (very major discrepancy)”, aslında “duyarlı” olduğu bir ilaca “dirençli” olarak bildirilmesi “büyük hata (major discrepancy)”, aslında “orta derecede duyarlı” olduğu bir ilaca “duyarlı” veya “dirençli” olarak bildirilmesi ise “küçük hata (minor discrepancy)” olarak sınıflandırılır [60].

INH’a duyarlılığın belirlenmesinde MGIT ve MODS yöntemiyle elde edilen sonuçlar arasında dört suşta uyumsuzluk gözlenmiştir (Tablo 4-15). İNH’a dirençli bulunan dört suş MODS yöntemiyle duyarlı bulunmuş ve MODS yönteminin İNH’a duyarlılığın belirlenmesinde çok büyük hata oranı %5,63 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4-15 . INH’a duyarlılığın belirlenmesinde MGIT ve MODS yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması

INH	MGIT-R	MGIT-S	Toplam
MODS - R	27	0	27
MODS - S	4	40	44
Toplam	31	40	71

RİF’e duyarlılığın belirlenmesinde MGIT ve MODS yöntemiyle elde edilen sonuçlar arasında dört suşta uyumsuzluk gözlenmiştir (Tablo 4-16). MGIT sistemiyle RİF’e dirençli olduğu bulunan iki suş MODS yöntemiyle duyarlı; MGIT sistemiyle RİF’e duyarlı olduğu bulunan iki suş ise MODS yöntemiyle dirençli bulunmuştur. MODS yönteminin RİF’e duyarlılığının belirlenmesinde çok büyük hata oranı ve büyük hata oranı %2,82 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4-16. RİF’e duyarlılığın belirlenmesinde MGIT ve MODS yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması

RIF	MGIT-R	MGIT-S	Toplam
MODS - R	12	2	14
MODS - S	2	55	57
Toplam	14	57	71

ÇİD suşlarının belirlenmesinde MGIT ve MODS yöntemiyle elde edilen sonuçlar arasında üç suşta uyumsuzluk gözlenmiştir (Tablo 4-17). MGIT 960 sistemiyle

ÇİD olduğu saptanan bir suş MODS yöntemiyle saptanamamış, MODS yöntemiyle ÇİD olarak kaydedilen iki suşun ise MGIT 960 sistemiyle ÇİD olmadığı saptanmıştır.

Tablo 4-17. ÇİD suşlarının belirlenmesinde MGIT ve MODS yöntemlerine ait sonuçların karşılaştırılması

ÇİD	MGIT-P	MGIT-N	Toplam
MODS - P	12	2	14
MODS - N	1	56	57
Toplam	13	58	71

P: pozitif, N: negatif

MODS kültürü MTBC açısından pozitif olarak kaydedilen fakat yapılan identifikasyon testlerinde *M. abscessus* olduğu belirlenen üç suş MODS yöntemiyle ÇİD olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda elde edilen bu bulgu başta kord oluşturanlar olmak üzere TDM'lerin MODS yöntemi ile TB ve ÇİD-TB tanısında yalancı pozitifliğe neden olabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Bu sorunun önlenmesi için MODS yönteminde ilaçsız besiyeri içeren kuyucuklardan birine PNB eklenerek MTBC'lerin TDM'lerden ayırt edilmesinin sağlanması önerilmiştir [7]. Bu çalışmada TB ve ÇİD-TB tanısında yalancı pozitif sonuçlar ciddi sorunlar doğurabileceğinden TB'nin mikrobiyolojik tanısında tek başına MODS yöntemi kullanılacaksa, ya yukarıda belirtildiği gibi yöntemin özgüllüğünü arttıracak değişiklikler yapılması (kuyucuklardan birine PNB eklenmesi) ya da MODS yöntemi ile alınan sonuçların, ucuz ve hızlı ek identifikasyon deneyleri ile doğrulanması (örn. MPT64 antijeni tayini) gerektiği ortaya çıkmıştır.

MGIT 960 sisteminde yapılan indirekt duyarlılık deneyi sonuçları referans olarak alındığında MODS yönteminin MTBC suşlarında İNH ve RİF direncini belirlemedeki duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si İNH için sırasıyla %87,10, %100,%100, ve %90,91, RİF için sırasıyla %85,7, %96,49, %85,71 ve %96,49 olarak bulunmuştur. MODS yönteminin ilaçlara duyarlılığın belirlenmesinde doğruluğu İNH ve RİF için sırasıyla %94,37 (kappa değeri 0,884) ve %94,37 (kappa değeri 0,822) olarak bulunmuştur. ÇİD suşların saptanmasında MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si sırasıyla %92,31, %96,55, %85,71 ve %98,25 olarak bulunmuş doğruluğunun ise %95,77 (kappa değeri 0,863) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-18).

Tablo 4-18. İNH'a ve RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde ve ÇİD suşlarının tanımlanmasında MODS yönteminin değeri

	İNH	RİF	ÇİD
Duyarlılık (%95 GA)	%87,10 (75,3-98,9)	%85,71 (67,4-100)	%92,31 (77,8-100)
Özgüllük (%95 GA)	%100 (100-100)	%96,49 (91,7-100)	%96,55 (91,9-100)
PPV (%95 GA)	%100 (100-100)	%85,71 (67,4-100)	%85,71 (67,38-100)
NPV (%95 GA)	%90,91 (82,4-99,4)	%96,49 (91,7-100)	%98,25 (94,9-100)
Doğruluk (%95 GA)	%94,37 (89-99,73)	%94,37 (89-99,73)	%95,77 (91,1-100)

ARB negatif örneklerde hem MODS yöntemiyle hem de MGIT 960 sistemiyle MTBC varlığı saptanan üç örnek bulunmaktadır. Bu üç örnekten izole edilen suşların duyarlılıkları karşılaştırılmıştır ve her iki yöntemle de bir suşun hem İNH'a hem de RİF'e dirençli (ÇİD), iki suşun ise her iki ilaca duyarlı olduğu tespit edilmiştir. ARB negatif balgam örneklerinde MODS yönteminin İNH'a ve RİF'e direnci ve ÇİD suşları saptamadaki duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si, NPV'si ve doğruluğu %100 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte ARB negatif örneklerde değerlendirme sadece üç örnekte yapılabilmektedir. MODS yönteminin ARB negatif örneklerde İNH'a ve RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde ve ÇİD suşların saptanmasındaki performansının daha fazla örnekle çalışıldığında değerlendirilmesi uygun bulunmuştur.

ARB pozitif örneklerde hem MODS yöntemiyle hem de MGIT 960 sistemiyle 68 örnekte MTBC varlığı saptanmıştır. Örneklerde üreyen 68 suşun MODS yöntemiyle 26'sının (%38,24) İNH'a, 13'ünün (%19,12) RİF'e ve 13'ünün (%19,12) her iki ilaca da dirençli (ÇİD) olduğu belirlenmiştir. MGIT 960 sistemiyle ise 30'unun (%44,12) İNH'a, 13'ünün (%19,12) RİF'e, 12'sinin (%17,65) her iki ilaca da dirençli (ÇİD) olduğu belirlenmiştir. MGIT 960 sisteminde yapılan indirekt duyarlılık deneyi sonuçları referans olarak alındığında, MODS yönteminin ARB pozitif balgam örneklerinde ilaçlara direnci belirlemedeki duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si İNH için sırasıyla %86,67, %100, %100 ve %90,48, RİF için sırasıyla %84,62, %96,36, %84,62 ve %96,36 olarak bulunmuştur. ARB pozitif örneklerde MODS yönteminin ilaçlara duyarlılığı belirlemedeki doğruluğunun İNH için %94,12 (kappa değeri 0,879), RİF için %94,11(kappa değeri 0,810) olduğu bulunmuştur. ÇİD suşların saptanmasında MODS

yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si sırasıyla %91,67, %96,43, %84,62 ve %98,18 olarak bulunmuştur ve doğruluğunun %95,59 (kappa değeri 0,853) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-19).

Tablo 4-19. İNH'a ve RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde ve ÇİD suşlarının tanımlanmasında ARB pozitif örnekler için MODS yönteminin değeri

	İNH	RİF	ÇİD
Duyarlılık (%95 GA)	%86,67 (74,5-98,8)	%84,62 (65-100)	%91,67 (76-100)
Özgüllük (%95 GA)	%100 (100-100)	%96,36 (91,4-100)	%96,43 (91,6-100)
PPV (%95 GA)	%100 (100-100)	%84,62 (65-100)	%84,62 (65-100)
NPV (%95 GA)	%90,48 (81,6-99,4)	%96,36 (91,4-100)	%98,18 (94,7-100)
Doğruluk (%95 GA)	%94,12 (88,53-99,71)	%94,12 (88,53-99,71)	%95,59 (90,71-100)

4.3. Sonuçların elde edilme süresi

MGIT, MODS ve LJ kültürlerinde medyan kültür pozitifliği süresi tüm örneklerde, ARB negatif ve ARB pozitif örneklerde ayrı ayrı hesaplanmıştır:

- tüm örneklerde sırasıyla 8 gün (çeyrek değerler genişliği [IQR] 6-10,5 gün), 8 gün (IQR 6-11 gün) ve 20 gün (IQR 15-21) olarak,
- ARB negatif örneklerde sırasıyla 17 gün (IQR 14-25,5 gün), 12 gün (IQR 10-15,5 gün) ve 17,5 gün (IQR 16-28 gün) olarak,
- ARB pozitif örneklerde ise sırasıyla 8 gün (IQR 6-9 gün), 7,5 gün (IQR 6-11 gün) ve 20 gün (IQR 15-21 gün) olarak bulunmuştur.

Duyarlılık sonuçları MGIT 960 sistemiyle yapılan indirekt duyarlılık deneyinde medyan 20 günde (IQR 18-23 gün), MODS yöntemiyle yapılan direkt duyarlılık deneyinde medyan 8 günde (IQR 6-11 gün) elde edilmiştir.

Yapılan karşılaştırmalarda MODS yöntemi ve MGIT 960 sistemi ile kültür pozitifliği süresinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken ($p=0,969$), MODS yöntemi ve MGIT 960 sistemi ile kültür pozitifliği LJ kültürüne kıyasla anlamlı ölçüde ($p=0,000$) daha kısa sürede elde edilmiştir.

Duyarlılık sonuçları MODS yöntemi ile MGIT 960 sisteminden anlamlı ölçüde ($p=0,000$) daha kısa sürede elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA

M. tuberculosis 'de ilaç direnci giderek artan bir sorun haline gelmiştir ve bu nedenle direncin saptanması için hızlı, ucuz ve kolay tekniklere ihtiyaç da artmaktadır. ÇİD ve YİD *M. tuberculosis* suşlarıyla infekte hastaların tedavisi güçtür ve uzun zaman alır, dahası bu hastaların infeksiyöz periyodları daha uzun sürmektedir. Bu nedenle ÇİD-TB ve YİD-TB'nin yayılımının engellenmesi için bu vakaların zamanında tanımlanması ilk ve en önemli adımdır. İlaç direncinin saptanmasında birçok yöntem vardır ancak çoğunun uzun zaman alması veya pahalı olması ya da uygulamasının zor olması ve deneyim gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır [8].

MODS yöntemi ucuz ve yaygın olarak bulunan laboratuvar ekipmanları ile gerçekleştirilebilecek hızlı bir yöntemdir. Bu yöntemde ilaç içeren ve içermeyen sıvı besiyerine hastalardan alınan örnekler inoküle edilmekte ve kültürler erken üreme veya mikrokoloni oluşumu açısından mikroskopta incelenmektedir. Böylelikle bu yöntemle hem örneklerde *M. tuberculosis*, varlığı hem de İNH'a ve RİF'e duyarlılıkları aynı anda ve hızlı bir şekilde belirlenmektedir. MODS yöntemini diğer kültür yöntemleri ve duyarlılık yöntemleriyle karşılaştıran çeşitli çalışmalar yapılmış ve sonuçları yayınlanmıştır [8-12,61-72].

Arias ve ark.[12] pulmoner TB şüphesi olan hastalardan alınan solunum yolu örneklerinde *M. tuberculosis* varlığının saptanmasında MODS yönteminin performansını değerlendiren prospektif bir çalışma gerçekleştirmiştir. Hastalardan alınan tüm örnekler mikroskopik olarak incelenmiş, LJ besiyerine ekilmiş ve MODS yöntemiyle değerlendirilmiştir. Örneklerin bir kısmının aynı zamanda MGIT 960 sistemi ile kültürü yapılmıştır. Çalışma kapsamında 854 hastaya ait 1639 örnek incelenmiştir. Örnek bazında değerlendirildiğinde, MODS yönteminin duyarlılığı %96,5 (%95 GA, 95,1-97,5), özgüllüğü %92,6 (%95 GA, 91,6-93,3), PPV'si %90,2 (%95 GA, 89,0-91,2), NPV'si %97,4 (%95 GA, 96,4-98,1) olarak belirlenmiş, LJ kültürü ve MODS yönteminin uyumu %94,2 (%95 GA, 93,1-95,1) olarak bulunmuştur. Kontamine kültür oranı MODS yönteminde LJ kültürüne kıyasla daha düşük bulunmuştur (sırasıyla %3,8 vs %5,8, $p<0,01$).

Reddy ve ark [61] HIV ile infekte hastalarda profilaktik İNH tedavisi öncesinde TB varlığının belirlenmesi için MODS yönteminin etkinliği ve hızını değerlendirmişler

ve mevcut tarama testleri ile karşılaştırmışlardır. Çalışmada iki adet balgam örneği veren 435 HIV (+) hastanın 27'sinde (%6,2) MODS yöntemiyle, 22'sinde (%5,1) LJ kültürü ile *M. tuberculosis* varlığı saptanmıştır. MODS yöntemi ve LJ kültürünün duyarlılığı sonuçlar örnek bazında değerlendirildiğinde sırasıyla %95 (%95 GA %85-99) ve %73 (%95 GA %57-85), hasta bazında değerlendirildiğinde sırasıyla %100 (%87-100) ve %81 (%62-94) olarak bulunmuştur ($p=0,07$, McNemar testi). MODS kültüründe örneklerin 65'inde (%7,3) kontaminasyon görülmüş, LJ kültürlerinde ise örneklerin 192'sinde (%22) kontaminasyon görülmüştür ($p<0,001$).

Shiferaw ve ark. [62] balgam örneklerinden eş zamanlı olarak *M. tuberculosis* varlığının ve İNH'a ve RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde MODS yöntemini değerlendirmiştir. Balgam örnekleri preparatı ARB açısından pozitif bulunan 262 hastadan alınmış (her hastadan 1 balgam örneği) ve MODS yöntemiyle (254/262;%96,9) LJ kültüründen (247/262; %94,3) anlamlı ölçüde ($p=0,016$) daha fazla örnekte *M. tuberculosis* varlığı saptandığı bildirilmiştir. MODS kültürlerinin 1'inde (%0,1) ve LJ kültürlerinin 4'ünde (%1,5) kontaminasyon görülmüştür.

Moore ve ark. [11] MODS yönteminin performansını üç farklı popülasyonda (TB şüphesi olan hastalar, daha önceden taranmış TB veya ÇİD-TB riski yüksek olan hastalar ve HIV ile infekte hastalar) değerlendirmiştir. Çalışmada MODS yöntemi otomatize mikobakteri kültürü (MB/Bac T sistemi) ve LJ kültürü ile karşılaştırılmıştır. Her üç kültür yöntemiyle de izole edilen tüm suşların *M. tuberculosis* olduğu spoligotiplendirme ve/veya PCR yöntemleri ile doğrulanmıştır. Kültürü yapılan 3760 balgam örneğinden 401'inde (%10,7) *M. tuberculosis* varlığı saptanmıştır. Balgam örneklerinde *M. tuberculosis* varlığının saptanmasında MODS yönteminin duyarlılığı %97,8, referans olarak kullanılan otomatize mikobakteri kültürü ve LJ kültürünün duyarlılığı ise sırasıyla %89,0 ve %84,0 olarak bulunmuştur ($p<0,001$). MODS yöntemi ve referans yöntemlerin duyarlılığı arasındaki bu fark tüm hasta gruplarında gözlenmiştir. MODS yöntemi, otomatize mikobakteri kültürü ve LJ kültürünün özgüllüğü sırasıyla %99,6, %99,9 ve %100 olarak bulunmuştur. İncelenen 3760 balgam örneğinin 739'unda (%20) en az bir yöntemde kontaminasyon görüldüğü, her üç yöntemle de kontaminasyon görülen örnek sayısının ise 63 (%1,7) olduğu belirlenmiştir. Kontaminasyon görülen örnek oranı MODS yöntemi için %8,1 (%95

GA, 7,2-9,0), otomatize mikobakteri kültürü için %4,4 (%95 GA, 3,8-5,3) ve LJ kültürü için %14,2 (%95 GA, 13,1-15,3) olarak bulunmuştur.

Ha ve ark. [63] HIV (+) hastalarda TB'nin erken tanısında MODS yöntemini değerlendirmiştir. TB şüpheli 307 HIV (+) hastadan toplanan 738 balgam örneği preparat hazırlanarak ve MGIT 960 sistemi ve MODS yöntemiyle kültür yapılarak incelenmiştir. Hasta bazında değerlendirildiğinde MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si sırasıyla %87,0 (%95 GA %82,3-93,1) %93,0, (%95 GA %85,3-97,4), %97,0 (%95 GA %93,6-98,9) ve %73,8 (%95 GA %64,5-81,9); örnek bazında değerlendirildiğinde sırasıyla %81,0 (% 95 GA %76,3-85,7), %97 (%95 GA %94,8-99,3), %98,6 (%95 GA %97,5-99,7) ve %66,4 (%95 GA %58,5-74,4) olarak bulunmuştur. MODS kültüründe bakteri/mantarlar ile kontaminasyon oranı %1,1 iken MGIT kültüründe bu oran %2,6 olarak bulunmuştur.

Coronel ve ark. [64] devam eden TB tedavisinin MODS yönteminin performansı üzerine etkisini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada, ilk seçenek TB tedavisi başarısız olan hastaları seçmişlerdir. Bu çalışmada ilk seçenek TB tedavisi başarısız olan 264 TB hastasından alınan balgam örneklerinin (her hastadan 1 balgam örneği) LJ ve MODS yöntemleriyle kültürü yapılmıştır. LJ ve MODS yöntemleriyle örneklerin 93'ünde (%35,23) kültür pozitif, 154'ünde (%58,33) kültür negatif bulunmuş; 17'sinde (%6,44) ise iki yöntemle uyumsuz sonuç alınmıştır. TB tedavisi devam eden hastalarda MODS ve LJ yöntemlerinin %96,0 (kappa değeri 0,92) oranında uyumlu olduğu belirlenmiştir. LJ kültürü ile karşılaştırıldığında TB tanısında MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si sırasıyla %93,0, %98,0, %96,9 ve %95,5 olarak bulunmuştur.

Ha ve ark. [65] TB'nin erken tanısında MODS yöntemini değerlendirmiştir. TB şüpheli 709 hastadan alınan balgam örneklerinin (her hastadan 1 balgam örneği) MODS yöntemi, LJ besiyeri ve MGIT 960 sistemi ile kültürleri yapılmıştır. MODS yöntemiyle kord görülen ve pozitif olarak tanımlanan 3 örnekte TDM olduğu belirlenmiştir. TB tanısında MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü PPV'si ve NPV'si sırasıyla %89,0 (%95 GA %85,4-91,9), %92,3 (%95 GA %88,9-94,9), %92,7 (%95 GA %89,5-91,5) ve % 88,3 (%95 GA %84,5-91,5) olarak bulunmuştur.

Makamure ve ark. [66] HIV prevalansı yüksek bölgelerde yaşayan ÇİD-TB şüpheli hastalarda MODS yöntemini değerlendirmiştir. MODS kültürünün tanısal

doğruluğu, referans yöntemler olarak LJ kültürü ve manuel MGIT sistemi ile; MODS yöntemi ile yapılan direkt duyarlılık deneyinin doğruluğu ise referans yöntem olarak mutlak konsantrasyon yöntemi (indirekt) ile karşılaştırarak değerlendirmiştir. Çalışmada ilaca dirençli TB şüpheli 99 hastadan alınan 138 balgam örneği incelenmiştir. HIV durumu bilinen hastaların %66 'sının (39/59) HIV (+) olduğu, hastaların %86'sının önceden TB tedavisi almış olduğu ve hastaların %80'inin örneklerin toplanma zamanında TB tedavisi görmekte olduğu belirtilmiştir. MODS yönteminin örneklerde *M. tuberculosis* varlığını saptamadaki duyarlılığı %85 (%95 GA, %69-95), özgüllüğü %93 (%95 GA, %84-98) olarak bulunmuş ve yöntemin tanısal doğruluğunun HIV enfeksiyonu durumu ile anlamlı ölçüde değişmediği belirlenmiştir. Kontaminasyon oranları (sonrasında başarılı bir şekilde dekontamine edilen örnekler dahil) MODS yöntemi (9/138, %6,5), manuel MGIT (15/138, %10,9) ve LJ kültüründe (8/138, %5,8) benzer bulunmuştur ($p=0,81$).

Caviedes ve ark [10] MODS yöntemini, çeşitli kültür yöntemleri (manuel MGIT, LJ ve mikroagar 7H11 kültürü) ve PCR yöntemi ile karşılaştırmıştır. Çalışmada incelenen 172 balgam örneğinden 98'i (%57) en az bir standart kültür yöntemi (manuel MGIT, LJ veya mikroagar 7H11) ile MTBC açısından pozitif bulunmuştur. Tüm pozitif örneklerde MTBC varlığı PCR deneyi ile doğrulanmıştır. Balgam örneklerinde *M. tuberculosis* varlığının saptanmasında MODS, manuel MGIT, LJ ve mikroagar 7H11 kültürü ve PCR deneyinin duyarlılığı sırasıyla %92, %93, %76, %78 ve %90 olarak bulunmuştur. Kontaminasyon oranları MODS, manuel MGIT, LJ ve mikroagar 7H11 kültürlerinde sırasıyla %2, %4, %1 ve %1 olarak belirlenmiştir.

Shah ve ark [67] MODS yönteminin tanısal doğruluğunu belirlemek için bu yöntemi katı (7H11 agar) ve sıvı (MGIT 960) kültür yöntemleriyle karşılaştırmış ve MODS yönteminin duyarlık ve özgüllüğünü sırasıyla %85 (%95 GA, %78-92) ve %97 (%95 GA, %95-99) olarak bulmuşlardır. Çalışmaya dahil edilen hastaların %78'inin HIV (+) olduğu ve MODS yönteminin performansının hastaların HIV ile infekte olup olmamalarıyla değişmediğini belirlemişlerdir (HIV ile infekte olan ve olmayan hastalarda MODS yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %88 vs %90 ve %97 vs %100 olarak bulunmuştur). Çalışmada MODS kültürlerinde kontaminasyon görülmemiştir.

Lazarus ve ark [68], MODS yöntemini konvansiyonel kültür (LJ kültürü) ve ilaç duyarlılık deneyleri (%1 proporsiyon yöntemi) ile karşılaştırmak amacıyla prospektif bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışma kapsamında 302 balgam örneği incelenmiştir. Her iki yöntemle (LJ ve MODS) 160 (%52,98) örnekte *M. tuberculosis* varlığı saptanmış, 118 (%39,07) örnek ise her iki yöntemle de kültür negatif bulunmuştur. Tek başına MODS kültürü ile 14 (%4,63) örnekte, tek başına LJ kültürüyle 10 (%3,31) örnekte daha *M. tuberculosis* varlığı saptanmıştır. LJ kültürü ile yapılan karşılaştırmalarda MODS yönteminin duyarlılığı %94,12 (%95 GA %91,46-96,77), özgüllüğü %89,39 (%95 GA %85,92-92,87), PPV'si %91,95 (%95 GA 88,89-95,02) ve NPV'si %92,19 (%95 GA %89,16-95,21) olarak belirlenmiştir. Kontaminasyon oranları MODS kültüründe %7, LJ kültüründe ise %5 olarak bulunmuştur.

TB tanısında MODS yöntemini değerlendiren çalışmalarda genel olarak yöntemin duyarlılığı %80'in üzerinde ve özgüllüğü %90'ın üzerinde bulunmuştur. Tüm örneklerle (hem ARB negatif hem ARB pozitif) ait veriler değerlendirildiğinde çalışmamızda da yukarıda detayları verilen çalışmalara benzer şekilde balgam örneklerinde MTBC varlığının saptanmasında MODS kültürünün duyarlılığı (%95,94), özgüllüğü (%98,83), negatif (%98,83) ve pozitif (%95,94) tahmin ettirici değerleri yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda toplam üç örnekte (biri ARB pozitif, ikisi ARB negatif) MODS yöntemiyle MTBC varlığı saptanamamıştır ancak bu örneklerin ait olduğu hastaların diğer balgam örneklerinde MODS yöntemiyle MTBC varlığı saptanmıştır. MODS yöntemiyle MTBC varlığı saptanamayan ARB negatif iki örnekten biri MGIT cihazında 21. günde, diğeri 30. günde üremiştir. Ayrıca pozitif MGIT besiyerinden yapılan preparatta kord varlığı görülememiştir. Bu iki örnekte MODS yöntemiyle MTBC varlığının saptanamamasının nedeni, örnekte çok az sayıda mikobakteri bulunması ve 21 günlük inceleme süresinde kord oluşumunun gözlenebileceği düzeyde üreme olmaması şeklinde değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda MODS kültürü pozitif bulunan üç örnekte, yapılan identifikasyon deneyleri sonucunda TDM (*M. abscessus*) ürediği belirlenmiştir. Bu örneklerin pozitif MGIT besiyerinden yapılan preparatlarında da kord varlığı gözlenmiştir. Bu bulgu MODS kültürü ile TB'nin mikrobiyolojik tanısında kord oluşturan TDM'lerin yalancı pozitifliğe yol açabileceğini ortaya koymuştur.

TB tanısında MODS kültürünü standart kültür yöntemleriyle karşılaştıran çalışmalar ve bu çalışmaya ait veriler Tablo 5-1’de özetlenmiştir.

Tablo 5-1. TB tanısında MODS kültürünü standart kültür yöntemleriyle karşılaştıran çalışmalara ait veriler

Kaynak	Referans yöntem	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPV (%)	NPV (%)
Arias ve ark. 2007 [12]	LJ kültürü	96,5	92,6	90,2	97,4
Reddy ve ark. 2010 [61]	LJ kültürü	95	VMD	VMD	VMD
Moore ve ark. 2006 [11]	MB/Bac T otomatize kültür, LJ kültürü	97,8	99,6	97,0	99,7
Ha ve ark. 2010 [63]	Yayma preparat, MGIT 960 kültürü	81,0	97,0	98,6	66,4
Coronel ve ark. 2013[64]	LJ kültürü	93,0	98,0	96,9	95,5
Ha ve ark. 2012 [65]	LJ kültürü, MGIT 960 kültürü	89,0	92,3	92,7	88,3
Makamure ve ark. 2013 [66]	LJ kültürü, manuel MGIT kültürü	85,00	93,00	88,00	92,00
Shah ve ark. 2011 [67]	7H11 agar kültürü MGIT 960 kültürü	85,00	97,00	88,00	96,00
Lazarus ve ark. 2012 [68]	LJ kültürü	94,12	89,39	91,95	92,19
Bu çalışma	LJ kültürü, MGIT 960 kültürü	95,95	98,83	95,95	98,83

VMD: veri mevcut değil

Preparat sonucunun MODS kültürünün performansı üzerine etkisi incelendiğinde, beklendiği gibi MODS kültürünün duyarlılığı ARB negatif örneklerde genel olarak daha düşük, ARB pozitif örneklerde ise genel olarak daha yüksek bulunmuştur.

Arias ve arkadaşlarının çalışmasında [12] pulmoner TB’li 357 hastanın 83’üne (%23,25) ait tüm örneklerin ARB negatif olduğu ve ARB negatif 83 TB vakasının MODS yöntemiyle 75’inin (%90,4) saptandığı belirtilmiştir. Hasta bazında yapılan değerlendirmede ARB negatif TB vakalarında MODS yönteminin özgüllüğü, PPV’si ve NPV’si sırasıyla %94,0 (%95 GA, %92,0-95,5), %90,1 (%95 GA, %87,0-92,7) ve %84,9 (%95 GA, %83,2-86,3) olarak bulunmuştur. Preparat sonuçlarına bakılmaksızın yapılan değerlendirmede TB vakalarını saptamada MODS yönteminin duyarlılığı (hasta bazında) %97,5 iken ARB negatif örneklerde duyarlılığının (hasta bazında) %90,4’e düştüğü belirlenmiştir.

Shah ve arkadaşlarının çalışmasında [67] incelenen balgam örneklerinin 470'inin ARB negatif olduğu belirtilmiştir. ARB negatif 50 örneğin kültürü pozitif bulunmuş ve bu örneklerin 14'ünde (%28) MODS yöntemiyle MTBC varlığı saptanamamıştır. ARB negatif örneklerde MODS kültürünün duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %72 (%95 GA, %60-84) ve %97 (%95 GA, %95-99) olarak bulunmuştur. MODS yönteminin duyarlılığının, preparat sonucuna bakılmaksızın değerlendirildiğinde %85 iken ARB negatif örneklerde yapılan değerlendirmede %72'ye düştüğü özgüllüğünde ise bir fark (her iki değerlendirmede de %97) gözlenmediği belirlenmiştir.

Ha ve arkadaşlarının çalışmasında [63], 122 hastadan alınan 315 örneğin ARB negatif olduğu belirlenmiştir. Bu 122 hastanın 15'inin (%12,29) sadece MGIT yöntemiyle, 40'ının (%32,79) hem MGIT hem de MODS yöntemiyle kültürü pozitif bulunmuştur. MODS yöntemiyle, kültürü pozitif olan 55 hastanın 40'ı (%73) saptanabilmiştir. Bu çalışmadan alınan verilerin sunulduğu meta analizde [69] hasta bazında sunulan veriler değerlendirildiğinde MODS yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %73 (%95 GA %59-84) ve %100 (%95 GA %95-100) olarak bulunmuştur. MODS yönteminin duyarlılığının, preparat sonucuna bakılmaksızın değerlendirildiğinde %87 iken ARB negatif örneklerde yapılan değerlendirmede %73'e düştüğü; özgüllüğünün ise %93 iken %100'e çıktığı belirlenmiştir.

Coronel ve arkadaşlarının [64] çalışmasında ilk seçenek TB tedavisi başarısız olan 264 hastadan birer balgam örneği alınmış, alınan örneklerden hazırlanan yayma preparatlar auramin yöntemiyle boyanmış ve 123'ü (%46,6) ARB negatif olarak bulunmuştur. ARB negatif 123 örneğin 20'sinin (%16,3) LJ ve/veya MODS kültürü pozitif bulunmuş, geriye kalan örneklerin (n=103) her iki kültürlerinde de üreme olmamıştır. Çalışmada sunulan veriler kullanılarak yapılan hesaplamada MODS yönteminin ARB negatif örneklerde TB tanısında duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si (%95GA) sırasıyla, %75 (%56,02-93,98), %100 (%100-100), %100 (%100-100) ve %95,37 (%91,41- 99,33) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada MODS kültürünün duyarlılığının preparat sonucuna bakılmaksızın değerlendirildiğinde %93 iken ARB negatif örneklerde %75'e düştüğü; özgüllüğünün ise %98'den %100'e çıktığı belirlenmiştir.

Walusimbi ve arkadaşları [69] tarafından 2013 yılında yayımlanan meta analizde yayma preparatı negatif pulmoner tüberküloz vakalarının saptanmasında GeneXpert,

MODS ve DSÖ'nün 2007 yılı algoritmasının performansı değerlendirilmiştir. Meta analizde MODS yöntemini değerlendiren 5 çalışmaya ait veriler toplanmış ve MODS yönteminin preparatı negatif pulmoner TB vakalarının saptanmasında duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 73 ve % 91 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda da benzer bir şekilde ARB negatif örneklerde negatif kültür oranı yüksek olduğundan, MODS yönteminin özgüllüğü (%98,83'ten % 99,21'e) ve NPV'sinde (%98,83'ten %99,21'e) hafif bir yükselme gözlenmiş, bununla birlikte sadece iki örnekte yalancı negatif sonuç alınmasına rağmen duyarlılığı ve PPV'sinde belirgin bir düşüş (her iki değer için de %95,95'ten %60'a) göze çarpmıştır. Bunun nedeni çalışma kapsamında incelenen ARB negatif 257 örneğin referans yöntemle sadece beşinde (%1,95) MTBC varlığının saptanmış olmasıdır. Bu çalışmada ARB negatif örneklerde kültür pozitifliği oranı çok düşük olduğundan, yöntemin duyarlılığı ve PPV'sine ilişkin istatistiksel olarak anlamlı bir değerlendirme yapmak mümkün olmamıştır, bu durum yapılan hesaplamalarda bu iki değer için %95 GA'nın geniş olmasıyla da (her iki değer için %95 GA, %17,1-100) görülmektedir. ARB negatif örneklere ait verilerin değerlendirildiği çalışmaların sonuçları ve bu çalışmaya ait sonuçlar Tablo 5-2'de verilmiştir.

Tablo 5-2. TB tanısında MODS kültürünü ARB negatif örnekler için değerlendiren çalışmalara ait veriler

Kaynak	Referans yöntem	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPV (%)	NPV (%)
Arias ve ark [12]	LJ kültürü, MGIT 960 kültürü	90,4 ^a	94,0 ^a	90,1 ^a	84,9 ^a
Ha ve ark. 2010 ^b [63]	MGIT 960 kültürü	73 ^a	100 ^a	VMD	VMD
Shah ve ark. 2011 [67]	7H11 agar kültürü MGIT 960 kültürü	72	97	74	97
Coronel ver ark. 2013 [64] ^c	LJ kültürü	75	100	100	95,37
Walusimbi ve ark. 2013 [69] ^d	LJ/7H10 agar/ BACTEC 460/ MGIT 960 kültürü	73	91	VMD	VMD
Bu çalışma	LJ kültürü, MGIT 960 kültürü	60	99,2	60	99,2

^a Veriler hasta bazında yapılan değerlendirmenin sonucudur. ^b Veriler 69 nolu kaynaktan alınmıştır. ^c Çalışmada ARB negatif örneklere ilişkin sunulan veriler kullanılarak yapılan hesaplamaların sonucu verilmiştir. ^d Kaynak bir meta analizdir.

Shah ve arkadaşlarının çalışmasında [67] 64 ARB pozitif örneğin 63'ünde (%98,44) kültür pozitif bulunmuştur. Kültür pozitif örneklerin 3'ü (%4,76) MODS yöntemiyle saptanamamıştır. Bu çalışmada MODS kültürünün duyarlılığı preparat sonucuna bakılmaksızın değerlendirildiğinde %85 (%95 GA, %78-92) iken ARB pozitif örneklerde %95 (%95 GA, %90-100)'e çıktığı belirtilmiştir.

Coronel ve arkadaşlarının [64] çalışmasında ilk seçenek TB tedavisi başarısız olan 264 hastadan birer balgam örneği alınmış, alınan örneklerden hazırlanan yayma preparatlar auramin yöntemiyle boyanmış ve 141'inin (%53,41) ARB pozitif olduğu belirlenmiştir. ARB pozitif olan 141 örneğin 78'inin (%55,32) hem LJ hem de MODS kültürü pozitif bulunmuş, 51'inin (%36,2) kültüründe her iki yöntemle de üreme görülmemiştir. ARB pozitif örneklerde TB tanısında MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si preparatta görülen ARB sayısına göre ARB 1+ örnekler için sırasıyla %79,3, %95,2, %92,0 ve %87,0; ARB 2+ örnekler için sırasıyla % 92,9, %81,8, %92,9 ve %81,8; ARB 3+ örnekler için sırasıyla %100, %100, %100 ve %100 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada preparatta görülen ARB sayısının artmasıyla MODS yönteminin duyarlılığı da artmıştır (ARB 1+ örneklerde %79,3 iken ARB 2+ örneklerde %92,9'a ve ARB 3+ örneklerde %100'e çıkmıştır).

Çalışmamızda da benzer bir şekilde ARB pozitif örneklerde kültür pozitifliği oranı yüksek olduğundan MODS kültürünün duyarlılığı (%95,95'ten %98,55'e) ve PPV'si (%95,95'ten %98,55'e) yükselmiştir, bununla birlikte ARB pozitif tek bir örnekte yalancı pozitif sonuç alınmasına rağmen özgüllüğü (% 98,83'ten %80'e) ve NPV'si (% 98,83'ten %80'e) belirgin ölçüde düşmüştür. Bunun nedeni çalışma kapsamında incelenen ARB pozitif 74 örneğin referans yöntemle sadece beşinde (%6,75) kültür sonucunun negatif bulunmuş olmasıdır. Bu çalışmada ARB pozitif örneklerde kültür negatifliği oranı düşük olduğundan yöntemin özgüllüğü ve NPV'sine ilişkin istatistiksel olarak anlamlı bir değerlendirme yapmak mümkün olmamıştır, bu durum yapılan hesaplamalarda bu iki değer için %95 GA'nın geniş olmasıyla da (her iki değer için %95 GA, %44,9-100) görülmektedir. ARB pozitif örneklere ait verilerin değerlendirildiği çalışmanın sonuçları ve bu çalışmaya ait sonuçlar Tablo 5-3'de özetlenmiştir.

Tablo 5-3. TB tanısında MODS kültürünü ARB pozitif örnekler için değerlendiren çalışmalara ait veriler

Kaynak	Referans yöntem	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPV (%)	NPV (%)
Shah ve ark 2011[67]	7H11 agar kültürü, MGIT 960 kültürü	95	VMD	100	VMD
Coronel ve ark 2013 [64] ^a	LJ kültürü	79,3-100	95,2-100	92,0-100	87,0-100
Bu çalışma	LJ kültürü, MGIT 960 kültürü	98,55	80,00	98,55	80,00

^a Çalışmada ARB pozitif örneklerde sonuçlar preparatlardaki ARB sayısına göre ayrı ayrı verilmiştir. Bu nedenle tabloda veriler ARB pozitif örnekler için verilen en düşük ve en yüksek değerlerin aralığı olarak belirtilmiştir. VMD: veri mevcut değil.

MODS yönteminde balgam örnekleri hem ilaçsız hem de İNH ve RİF içeren kuyucuklara inoküle edildiğinden eş zamanlı olarak duyarlılık sonuçları da elde edilmektedir. MODS yönteminin ilaçlara duyarlılığın belirlenmesindeki ve ÇİD-TB tanısındaki performansını inceleyen çalışmalar ve bu çalışmalardaki sonuçların kullanıldığı birkaç meta analiz yayımlanmıştır. Meta analizlerde MODS yöntemi haricinde fenotipik ve genotipik diğer duyarlılık deneyleri de incelenmiştir, bu tez projesinin konusu MODS yönteminin değerlendirilmesi olduğundan aşağıda sadece bu meta analizlerdeki MODS yöntemine ilişkin sonuçlar verilmiştir.

Mello ve ark.[70] ilaca dirençli pulmoner TB şüpheli hastalarda MODS yönteminin ilaca direnci saptamadaki performansını değerlendirmiştir. Referans olarak LJ besiyerinde yapılan indirekt agar proporsiyon yöntemi kullanılmıştır. İlaça dirençli TB riski olan 351 hastadan alınan örneklerin 180'inde hem MODS hem de LJ kültüründe *M. tuberculosis* varlığı saptanmıştır. LJ besiyerinde yapılan indirekt agar proporsiyon yöntemiyle 69 suşun (%38,3) ÇİD olduğu belirlenmiş, MODS yöntemiyle ÇİD *M. tuberculosis* suşlarının %95,7'sinin (66/69) doğru olarak tanımladığı belirtilmiştir. LJ besiyerinde yapılan indirekt agar proporsiyon ile karşılaştırıldığında MODS yönteminin (örnekler sulandırılmaksızın inoküle edildiğinde) İNH'a direnci belirlemede duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si, NPV'si ve doğruluğu sırasıyla %96,7 (%95 GA, 92,1–98,8), %78,4 (%95, GA %73,5–80,6), %82,4 (%95 GA %78,4–84,2), %95,8 (% 95 GA %89,9–98,5) ve %87,8 (%95 GA %83,0–89,9); RİF'e direnci belirlemede duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si, NPV'si ve doğruluğu sırasıyla %96,0 (%95 GA %90,3–

98,6), %82,9 (% 95 GA %78,8–84,7), %80,0 (%95 GA %75,2–82,1), %96,7 (%95 GA %91,9–98,8) ve %88,3 (%95 GA %83,6–90,5) olarak bulunmuştur.

Ejigu ve ark. [71] *M. tuberculosis* suşlarının İNH'a ve RİF'e duyarlılığının belirlenmesinde MODS yöntemi ve MGIT 960 sistemini karşılaştırmıştır. Bu çalışmada MODS yöntemiyle yapılan direkt duyarlılık deneyinin sonuçlarının otomatize MGIT 960 sistemi ile yapılan indirekt duyarlılık deneyinin sonuçları ile karşılaştırılması ve her iki yöntemle duyarlılık sonuçlarının elde edilme süresinin belirlenmesi amaçlanmıştır. MODS yönteminin ilaçlara direncin belirlenmesindeki duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si, NPV'si ve doğruluğu 0,1 µg/ml İNH için sırasıyla %97,0, %92,0, %94,1, %95,8 ve %94,8; 0,4 µg/ml İNH için sırasıyla %93,8, %96,0, %96,8, %92,3 ve %94,7; RİF için sırasıyla %95,0, %100, %100, %97,4 ve %98,3 olarak bulunmuştur. ÇİD-TB tanısında MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si, NPV'si ve doğruluğu sırasıyla %95,0, %100, %100, %97,4 ve %98,3 olarak belirlenmiştir.

Shiferaw ve ark [62] İNH'a ve RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde MODS yöntemini 7H10 besiyerinde yapılan agar proporsiyon yöntemi ile karşılaştırmıştır. Çalışma kapsamında ARB pozitif 262 balgam örneği incelenmiş, İNH'a duyarlılık 246, RİF'e duyarlılık 247 suş için belirlenmiştir. Referans olarak kullanılan indirekt agar proporsiyon yöntemiyle karşılaştırıldığında İNH'a ve RİF'e direncin belirlenmesinde ve ÇİD-TB tanısında MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si ve doğruluğu 0,1 µg/ml İNH için sırasıyla, %94,3, %96,9, %89,3, %98,4 ve %96,4; 0,4µg/ml İNH için sırasıyla %89,6, %98,5, %93,5, %97,5 ve %96,7; RİF için sırasıyla %92,3, %99,5, %96,0, %99,1 ve %98,8; ÇİD-TB için sırasıyla %92,0, %99,5, %95,8, %99,1 ve %98,8 olarak bulunmuştur.

Moore ve ark [11] antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılığın belirlenmesinde MODS yöntemini indirekt proporsiyon yöntemi ile karşılaştırmıştır. MODS yöntemi ve referans duyarlılık deneyi (proporsiyon yöntemi) sonuçları arasında RİF için %100, İNH için %96,7 ve RİF ile birlikte İNH (ÇİD) için %98,8 oranında uyum görülmüştür (kappa değerleri sırasıyla 1,0, 0,89 ve 0,93).

Coronel ve ark [64] devam eden TB tedavisinin MODS yönteminin performansı üzerine etkisini değerlendirmiştir. İlk seçenek TB tedavisi başarısız olan 264 hastadan alınan balgam (her hastadan bir balgam örneği) örneklerinden izole edilen suşların indirekt agar proporsiyon yöntemi ile İNH ve RİF'e duyarlılıkları Peru ulusal referans

laboratuvarında belirlenmiş ve MODS yöntemiyle yapılan direkt duyarlılık deneyi sonuçları ile karşılaştırılmıştır. MODS yönteminin İNH'a direncin belirlenmesinde duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si sırasıyla %97,4, %93,8, %98,7 ve %88,2; RİF'e direncin belirlenmesinde duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si sırasıyla %90,5, %100, %100 ve %74,1 olarak bulunmuştur. MODS yönteminin referans yöntemle ilaçlara duyarlılığın belirlenmesinde uyum oranı İNH için %96,8 (kappa 0,89), RİF için %92,6 (kappa 0,80) olarak belirlenmiştir. MODS yönteminin ÇİD-TB'nin saptanmasındaki duyarlılığı %95,8 olarak belirlenmiştir.

Ha ve ark. [65] ÇİD-TB tanısında hızlı, direkt ilaç duyarlılık testi olarak MODS yöntemini değerlendirmiştir. MGIT veya LJ kültüründe izole edilen suşlara, LJ besiyerinde proporsiyon yöntemiyle indirekt duyarlılık deneyi uygulanmıştır. Duyarlılık sonuçlarında MODS (0,4 µg/ml İNH ve 1 µg/ml RİF) yöntemi ve proporsiyon yöntemi (0,2 µg/ml İNH, 40 µg/ml RİF) arasında fark olması durumunda multipleks allel spesifik PCR yapılmıştır. Hem MODS yöntemiyle yapılan direkt duyarlılık deneyi hem de LJ besiyerinde yapılan indirekt duyarlılık deneyi sonuçları 300 örnek için belirlenmiştir. İNH'a ve RİF'e dirençli suşların saptanmasında MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si İNH için sırasıyla %72,6 (%95 GA %59,8-83,1), %97,9 (%95 G:% 95,2- 99,3), %90,0 (%95 GA %78,2-96,7) ve %93,2 (%95 GA %89,3-95,9); RİF için sırasıyla %72,7 (%95 GA %39,0-93,9), %99,7 (%95 GA %98,1-99,9), %88,9 (%95 GA %51,8-99,7) ve %98,9 (%95 GA %97,5-99,9) olarak bulunmuştur. MODS yönteminin ilaca direnci saptamada duyarlılığının düşük olması örneklerdeki bakteri yükünün az olması ve İNH konsantrasyonunun yüksek olmasıyla açıklanmıştır. MODS yönteminin ÇİD suşların saptanmasında duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si ve NPV'si sırasıyla %77,8 (%95 GA %39,9- 97,1), %99,7 (%95 GA %98,1-99,9), %87,5 (%95 GA %47,3-99,6) ve %99,3 (%95 GA %97,5-99,9) olarak bulunmuştur. ÇİD-TB tanısında MODS yönteminin referans yöntem ile uyum oranı ise %99,0 (kappa: 0,8, p<0,001) olarak bulunmuştur. MODS yöntemi ile yapılan duyarlılık deneyinin ÇİD-TB için PPV'sinin düşük olması çalışma popülasyonun ÇİD-TB oranının düşük olmasına bağlanmıştır. MODS yöntemiyle kord görülen ve pozitif olarak tanımlanan 3 örnekte TDM olduğu belirlenmiş, bu suşlardan hiçbiri ÇİD olarak tanımlanmamıştır.

Makamure ve ark [66] HIV prevelansı yüksek bölgelerde yaşayan ÇİD-TB şüpheli hastalarda MODS yöntemi ile yapılan direkt duyarlılık deneyi sonuçlarını

referans yöntem olarak indirekt mutlak konsantrasyon yöntemiyle karşılaştırmıştır. MODS yönteminin İNH'a ve RİF'e direnci ve ÇİD-TB'yi saptamadaki duyarlılığı sırasıyla %88 (%95 GA, %68-97) ,%96 (%95 GA, %79-100) ve %91 (%95 GA, %72-99), özgüllüğü ise sırasıyla %89 (%95 GA, %52-100), %89 (%95 GA, %52-100) ve %90 (%95 GA, %56-100) olarak bulunmuştur.

Caviedes ve ark [10] İNH'a ve RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde direkt MODS yöntemini indirekt mikro kuyucuk alamar mavisi (MABA) deneyi ile karşılaştırmıştır. Duyarlılık sonuçları 88 hastadan alınan örnekler için belirlenmiş ve bu 88 hastanın 33'ünün (%37,5) anti-TB tedavisi görmekte olduğu belirtilmiştir. İNH'a ve RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde iki yöntem arasında %89 oranında uyum gözlenmiştir.

Shah ve ark [67] MODS yönteminin İNH'a ve RİF'e direnci belirlemedeki performansını, referans yöntem olarak indirekt agar proporsiyon yöntemi ile karşılaştırılarak değerlendirmiş ve yöntemin İNH'a ve RİF'e direnci belirlemedeki duyarlılığını %100 ve özgüllüğünü ise sırasıyla %92 (%95 GA %85-99) ve %87 (%95 GA %78-96) olarak bulunmuşlardır. MODS yönteminin ÇİD-TB vakalarını %100 duyarlılık (%95 GA, %68-100) ve %94 özgüllükle (%95 GA %82-98) saptadığı belirlenmiştir.

Lazarus ve ark [68], MODS yöntemini konvansiyonel ilaç duyarlılık deneyi ile karşılaştırmıştır. MODS ve LJ kültürü pozitif bulunan 160 örnekten izole edilen suşların İNH'a ve RİF'e duyarlılıkları LJ besiyerinde %1 proporsiyon yöntemiyle araştırılmış ve sonuçlar MODS yöntemi ile belirlenen duyarlılık sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İNH'a ve RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde MODS yöntemi ve LJ besiyerinde yapılan proporsiyon yönteminin uyumu İNH için %90,8, RİF için %91,5 olarak bulunmuştur.

İlaça dirençli TB'nin hızlı tanısında MODS ve TLA yöntemini değerlendiren bir meta analizde [8], kabul edilebilir bir referans yöntem ile karşılaştırarak MODS yöntemini değerlendiren 9 çalışma incelenmiştir. MODS yöntemini değerlendiren 9 çalışmanın 2'sinde MABA deneyi, 1'inde MGIT 960 sistemi ile yapılan duyarlılık deneyi ve 6'sında proporsiyon deneyi referans yöntem olarak kullanılmıştır. MODS yönteminin RİF'e direncin belirlenmesinde duyarlılık ve özgüllüğünün sırasıyla %98,0 (%95 GA 94,5-99,3) ve %99,4 (%95 GA 95,7-99,9) olduğu bulunmuş; İNH'a direncin belirlenmesinde 0,1 µg/ml konsantrasyonda kullanıldığında duyarlılık ve özgüllük %97,7 (%95 GA 94,1-99,1) ve %95,8 (%95 GA 88,1-98,6) olarak bulunmuşken 0,4

$\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda kullanıldığında duyarlılığının %90,0 (%95 GA 84,5-93,7)'a düştüğü fakat özgüllüğünün %98,6 (%95 GA 96,9-99,4)'ya yükseldiği belirlenmiştir.

ÇİD-TB tanısında direkt duyarlılık testlerinin karşılaştırıldığı bir başka meta analizde, *M. tuberculosis* suşlarında RİF ve İNH'a direncin saptanmasında 4 direkt testin (iki fenotipik test: NRA, MODS ve iki ticari genotipik test: Genotype MTBDR ve Genotype MTBDR plus) duyarlılık ve özgüllüğü ve sonuç alınma süresi konvansiyonel indirekt yöntemler ile karşılaştırılmıştır. Meta analiz kapsamında 18 çalışma incelenmiştir (4'ü NRA, 6'sı MODS, 3'ü Genotype MTBDR ve 5'i Genotype MTBDRplus'a ait). Veriler toplandığında MODS yönteminin İNH'a ve RİF'e direncin saptanmasında duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %92 ve %96; %96 ve %96 olarak bulunmuştur [9].

Birinci seçenek ve ikinci seçenek antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılığın belirlenmesinde kullanılan fenotipik duyarlılık testlerinin tanısal doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini araştıran bir meta analizde ticari ve ticari olmayan fenotipik duyarlılık testleri ile yapılan çalışmalar incelenmiştir. İNH'a duyarlılığın belirlenmesinde direkt test olarak MODS (KK 0,1 $\mu\text{g/ml}$) yönteminin duyarlılığı %94,4 (%95 GA 90,1-96,9) ve özgüllüğü %91,8 (%95 GA, 82,9-96,2) olarak bulunmuştur. RİF'e duyarlılığın belirlenmesinde direkt test olarak kullanılan MODS (KK 1 $\mu\text{g/ml}$) yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %97,9 (%95 GA, 85,3-99,7) ve %98,8 (%95 GA, 90,8-99,8) olarak bulunmuştur. Ayrıca, MODS yönteminin İNH'a ve RİF'e duyarlılığı belirlemede doğruluğunun sırasıyla %92,9 (%95 GA, 88,9-96,8) ve %97,5 (%95 GA, 94,9-100) olduğu belirlenmiştir [47].

İlaça dirençli TB tanısında RİF direncinin belirlenmesinde kullanılan hızlı testlerin performansının irdelendiği bir sistematik derlemede genotipik testlerden INNO-LİPA Rif TB, Genotype MTBDR, Genotype MTBDRplus ve fenotipik testlerden NRA, MODS ve CRI yöntemleri ile yapılan çalışmalar incelenmiştir. MODS, yönteminin duyarlılığı (%95 GA) ve özgüllüğü (%95 GA) sırasıyla % 98,1 (93,2-99,5) ve %99,2 (94,7-99,9) olarak bulunmuştur. RİF direnci prevalansı $\leq$ % 30 olduğunda testin negatif tahmin ettirici değerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, RİF direnci prevalansı $<$ %5 olduğunda PPV'sinin belirgin ölçüde azaldığı belirtilmiştir [72].

Hem referans yöntem olan MGIT 960 sistemiyle, hem de MODS yöntemiyle MTBC varlığı saptanan suşlara ait duyarlılık sonuçları karşılaştırıldığında çalışmamızda İNH'a ve RİF'e direncin belirlenmesinde ve ÇİD-TB tanısında MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si, NPV'si ve doğruluğu yukarıda detayları verilen çalışmalara benzer bir şekilde yüksek bulunmuştur (Tablo 5-4).

Tablo 5-4. İNH'a ve RİF'e direncin belirlenmesinde ve ÇİD-TB tanısında MODS yönteminin değerini gösteren çalışma verileri

Kaynak	Referans yöntem	İlaç	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPV (%)	NPV (%)	Doğruluk/uyum (%)
Mello ve ark. 2007 [70]	Agar proporsiyon (indirekt)	İNH (0,1 µg/ml)	96,7	78,4	82,4	95,8	87,8
		RİF (2 µg/ml)	96,0	82,9	80,0	96,7	88,3
		ÇİD	95,0	100	100	97,4	98,3
Moore ve ark. 2006 [11]	Proporsiyon yöntemi (indirekt)	İNH (0,4µg/ml)	84,6	99,6	98,2	96,4	VMD
		RİF (1µg/ml)	100	100	100	100	VMD
		ÇİD	88,6	100	100	98,7	VMD
Coronel ve ark. 2013 [64]	Agar proporsiyon yöntemi (indirekt)	İNH	97,4	93,8	98,7	88,2	VMD
		RİF	90,5	100	100	74,1	VMD
Ha ve ark. 2012 [63]	Agar proporsiyon yöntemi (indirekt)	İNH (0,4µg/ml)	72,6	97,9	90,0	93,2	VMD
		RİF (1µg/ml)	72,7	99,7	88,9	98,9	VMD
		ÇİD	77,8	99,7	87,5	99,3	VMD
Lazarus ve ark. 2012 [68]	LJ proporsiyon (indirekt)	İNH	VMD	VMD	VMD	VMD	90,8
		RİF	VMD	VMD	VMD	VMD	91,5
Makamure ve ark. 2013 [66]	Mutlak konsantrasyon (indirekt)	İNH (0,4µg/ml)	88	89	96	73	VMD
		RİF (1µg/ml)	96	89	96	89	VMD
		ÇİD	91	90	96	82	VMD
Shah ve ark. 2011 [17]	Agar proporsiyon (indirekt)	İNH (0,4µg/ml)	100	92	69	100	VMD
		RİF (1µg/ml)	100	87	50	100	VMD
		ÇİD	100	93	64	100	
Shiferaw ve ark. 2007 [62]	Agar proporsiyon (indirekt)	İNH (0,1 µg/ml)	94,3	96,9	89,3	98,4	96,4
		İNH (0,4 µg/ml)	89,6	98,5	93,5	97,5	96,7

		RİF	92,3	99,5	96,0	99,1	98,8
		ÇİD	92,0	99,5	95,8	99,1	98,8
Ejigu ve ark. 2008 [71]	MGIT 960 (indirekt)	İNH (0,1 µg/ml)	97,0	92,0	94,1	95,8	94,8
		İNH (0,4 µg/ml)	93,8	96,0	96,8	92,3	94,7
		RİF (1µg/ml)	95,0	100	100	97,4	98,3
		ÇİD	95,0	100	100	97,4	98,3
Minion ve ark. 2010 [8] ^a	MABA, MGIT 960, proporsiyon yöntemi	İNH (0,1 µg/ml)	97,7	95,8	VMD	VMD	VMD
		İNH (0,4 µg/ml)	90,0	98,6	VMD	VMD	VMD
		RİF (1 veya 2 µg/ml)	98,0	99,4	VMD	VMD	VMD
Bwanga ve ark. 2009 [9] ^a	LJ/Agar proporsiyon yöntemi (indirekt), MGIT 960 (indirekt), MABA (indirekt)	İNH	92,0	96,0	VMD	VMD	VMD
		RİF	96,0	96,0	VMD	VMD	VMD
Horne ve ark. 2013 [47] ^a	LJ/Agar proporsiyon yöntemi, Bactec 460	İNH (0,1 µg/ml)	94,4	91,8	VMD	VMD	92,9
		RİF (1µg/ml)	97,9	98,8	VMD	VMD	97,5
Arentz ve ark. 2013 [72] ^a	LJ/Agar proporsiyon yöntemi (direkt ve indirekt), Bactec 460 (direkt)	RİF	98,1	99,2	VMD	VMD	VMD
Bu çalışma	MGIT 960 (indirekt)	İNH (0,4µg/ml)	87,09	100	100	90,90	94,36
		RİF (1µg/ml)	85,71	96,49	85,71	96,49	94,36
		ÇİD	92,30	96,55	85,71	98,24	95,77

^a Belirtilen çalışmalar meta analizdir.

MODS yönteminin ilaçlara duyarlılığın belirlenmesindeki ve ÇİD-TB tanısındaki performansını ARB negatif örneklerde değerlendiren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda hem MGIT sistemi hem de MODS yöntemiyle ARB negatif üç örnekte kültür pozitif bulunmuştur. Bu üç örnekte üreyen MTBC suşlarının MODS yöntemi ve MGIT 960 sistemi ile yapılan duyarlılık deneylerinde İNH'a ve

RİF'e duyarlılık sonuçları %100 uyumlu bulunmuştur. Fakat değerlendirme sadece üç örnek üzerinde yapılabildiğinden bu sonucun anlamlılığı tartışmalıdır.

MODS yönteminin direkt duyarlılık deneyi olarak performansını ARB pozitif örneklerde araştıran çalışmalarda çalışmamıza benzer şekilde MODS yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV'si, NPV'si ve doğruluğu yüksek bulunmuştur (Tablo 5-5).

Tablo 5-5. ARB pozitif örneklerde İNH'a ve RİF'e direncin belirlenmesinde ve ÇİD-TB tanısında MODS yönteminin değerini gösteren çalışma verileri

Kaynak	Referans yöntem	İlaç	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPV (%)	NPV (%)	Doğruluk (%)
Ejigu ve ark. 2008 [71]	MGIT 960 (indirekt)	İNH (0,1 µg/ml)	97,0	92,0	94,1	95,8	94,8
		İNH (0,4 µg/ml)	93,8	96,0	96,8	92,3	94,7
		RİF (1µg/ml)	95,0	100	100	97,4	98,3
		ÇİD	95,0	100	100	97,4	98,3
Shiferaw ve ark. 2007 [62]	Agar proporsiyon (indirekt)	İNH (0,1 µg/ml)	94,3	96,9	89,3	98,4	96,4
		İNH (0,4 µg/ml)	89,6	98,5	93,5	97,5	96,7
		RİF	92,3	99,5	96,0	99,1	98,8
		ÇİD	92,0	99,5	95,8	99,1	98,8
Bu çalışma	MGIT 960 (indirekt)	İNH (0,4µg/ml)	86,66	100	100	90,47	94,11
		RİF (1µg/ml)	84,61	96,36	84,61	96,36	94,11
		ÇİD	91,66	91,66	84,61	98,18	95,58

MODS kültürü MTBC açısından pozitif olarak kaydedilen fakat yapılan identifikasyon testlerinde *M. abscessus* olduğu belirlenen 3 suş MODS yöntemiyle ÇİD olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda elde edilen bu bulgu başta kord oluşturanlar olmak üzere TDM'lerin MODS yöntemi ile TB ve ÇİD-TB tanısında yalancı pozitifliğe neden olabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Bu sorunun önlenmesi için MODS yönteminde ilaçsız besiyeri içeren kuyucuklardan birine PNB eklenerek MTBC'lerin TDM'lerden ayırt edilmesinin sağlanması önerilmiştir [7,67]. TB ve ÇİD-TB tanısında yalancı pozitif sonuçlar ciddi sorunlar doğurabileceğinden, bu çalışmada, TB'nin mikrobiyolojik tanısında tek başına MODS yöntemi kullanılacaksa, ya yukarıda

belirtildiği gibi yöntemin özgüllüğünü arttıracılabilecek değışiklikler yapılması (kuyucuklardan birine PNB eklenmesi) ya da MODS yöntemi ile alınan sonuçların, ucuz ve hızlı ek identifikasyon deneyleri ile doğrulanması (örn. MPT64 antijeni tayini) gerektiği ortaya çıkmıştır.

Pulmoner TB şüphesi olan hastalardan alınan solunum yolu örneklerinde *M. tuberculosis* varlığının saptanmasında MODS yönteminin performansını değerlendiren Arias ve ark. [12] hem LJ kültüründe hem de MODS yöntemiyle *M. tuberculosis* varlığının saptandığı 657 örnekte medyan kültür pozitifliği süresinin LJ kültürü ile 21 gün (IQR, 17-25 gün), MODS yöntemiyle 7 gün (IQR 5-10 gün) ($p<0,01$) olduğunu belirtmiştir. Çalışmada örneklerin bir kısmının MGIT 960 sistemi ile de kültürü yapılmıştır. LJ kültürü, MGIT 960 sistemi ve MODS yöntemiyle *M. tuberculosis* varlığının saptandığı 64 örnekte medyan kültür pozitifliği süresi MODS yöntemi (7 gün; IQR, 7-10 gün) ve MGIT 960 sisteminde (8 gün; IQR, 6-11,5 gün) benzer bulunmuştur ($p=0,16$), LJ kültüründe (24,5 gün; IQR, 20-27,5 gün) ise bu sürenin belirgin ölçüde daha uzun olduğu belirlenmiştir.

HIV (+) hastalarda MODS yönteminin LJ kültürü ile karşılaştırıldığı Reddy ve arkadaşlarının çalışmasında [61] kültür pozitifliği süresi (medyan) MODS yöntemiyle 8 gün (IQR 7-10 gün) ve LJ kültürü ile 26 gün (IQR 21-33 gün) olarak bulunmuştur ($p<0,001$, Wilcoxon testi). Herhangi bir mikrobiyolojik test ile pozitif bulunan hastaların hepsinde 21 gün içerisinde, %96'sında 14 gün içerisinde MODS yöntemiyle kültür pozitif bulunduğu bildirilmiştir.

Moore ve arkadaşlarının çalışmasında [11] kültürde *M. tuberculosis* suşlarının saptanma (kültür pozitifliği) süresi (medyan) MODS yöntemi, otomatize mikobakteri kültürü ve LJ kültürü için sırasıyla 7 gün, 13 gün ve 26 gün olarak bulunmuştur.

Ha ve ark [63] HIV (+) hastalardan alınan örnekleri kültür yöntemi olarak MODS yöntemi ve MGIT 960 sistemi ile incelemiştir. MODS ve MGIT kültürü ile medyan saptama süresi sırasıyla 8 gün (IQR 6-10 gün) ve 11 gün (IQR 8-10 gün) olarak bulunmuştur.

Makamure ve arkadaşlarının çalışmasında [66] kültürün pozitifleşme süresinin (medyan) MODS yönteminde (7 gün, IQR 7-15 gün) manuel MGIT (12 gün, IQR 6-16 gün) ve LJ (28 gün, IQR 21-35 gün) yöntemlerine kıyasla anlamlı ölçüde ($p<0,001$) daha kısa olduğu bulunmuştur.

Caviedes ve arkadaşlarının çalışmasında [10] kültür yöntemleriyle medyan saptama süresi MODS, manuel MGIT, LJ ve mikroagar 7H11 için sırasıyla 9 gün (4-31 gün), 10 gün (4-39 gün), 24 gün (6-59 gün) ve 14,5 gün (4-28 gün) olarak bulunmuş, MODS yönteminin diğer kültür yöntemlerinden anlamlı ölçüde daha hızlı olduğu belirtilmiştir ($p < 0,05$).

Shah ve arkadaşlarının çalışmasında [67] medyan kültür pozitifliği süresinin MODS kültürü ile [9 gün (IQR 6-12gün)], MGIT [16 gün (IQR 12-48 gün)] ve 7H11 agar kültürüne [29 gün (IQR 20-41 gün)] kıyasla anlamlı ölçüde daha kısa olduğu belirlenmiştir (tüm ikili karşılaştırmalar için $p < 0,001$).

Lazarus ve arkadaşlarının çalışmasında [68], ortalama kültür pozitifliği süresi MODS kültüründe 9 gün, LJ kültüründe ise 21 gün olarak bulunmuştur.

MODS yöntemiyle kültür pozitifliği süresinin standart sıvı ve katı kültür yöntemleriyle karşılaştırıldığı çalışmalarda MODS yöntemiyle benzer veya daha kısa sürede sonuç elde edildiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda medyan kültür pozitifliği süresi MODS yöntemi için 7-9 gün olarak bulunmuşken, referans sıvı kültür yöntemleri için 8-16 gün, referans katı kültür yöntemleri için ise 21-29 gün olarak bulunmuştur. Çalışmamızda da medyan kültür pozitifliği süresinin diğer çalışmalarla uyumlu olarak MODS, MGIT ve LJ kültürleri için sırasıyla 8 gün, 8 gün ve 20 gün olduğu belirlenmiştir (Tablo 5-6).

Tablo 5-6. MODS ve referans kültür yöntemlerinde kültür pozitifliği süresinin karşılaştırıldığı çalışmalara ait veriler

Kaynak	Kültür yöntemleri	Kültür pozitifliği süresi (medyan)
Arias ve ark. 2007 [12]	MODS	7 gün
	MGIT	8 gün
	LJ	21 gün
Reddy ve ark. 2010 [61]	MODS	8 gün
	LJ	26 gün
Moore ve ark 2006 [11]	MODS	7 gün
	MBBacT	13 gün
	LJ	26 gün
Ha ve ark 2010 [63]	MODS	8 gün
	MGIT 960	11 gün
Shiferaw ve ark 2007 [62]	MODS	9 gün
Makamure ve ark 2013 [66]	MODS	7 gün
	Manuel MGIT	12 gün
	LJ	28 gün

Shah ve ark 2011 [67]	MODS	9 gün
	MGIT 960	16 gün
	7H11 agar	29 gün
Bu çalışma	MODS	8 gün
	MGIT 960	8 gün
	LJ	20 gün

MODS yönteminin konvansiyonel fenotipik duyarlılık testlerine kıyasla en önemli avantajı hızlı olmasıdır.

Bir meta analizde, yöntemlerin sonuç verme süreleri karşılaştırılmış, moleküler testler 1-2 gün içerisinde tamamlanırken, fenotipik testlerle (ortalama 23 gün) konvansiyonel testlerden (2 ay) çok daha hızlı sonuç alındığı; MODS yöntemiyle ise sonuçların çoğunun 7-14 gün içerisinde belirlendiği bildirilmiştir [9].

MGIT 960 sistemi ve MODS yönteminin karşılaştırıldığı Ejigu ve arkadaşlarının çalışmasında [71], MODS yönteminde ARB pozitif örnekler hücre kültür plaklarına inoküle edilmiş ve kültür ve duyarlılık sonuçları eş zamanlı olarak elde edildiğinden duyarlılık sonuçları kültür pozitifliğinin görüldüğü gün kaydedilmiştir. MGIT 960 sisteminde ise ARB pozitif örnekler LJ besiyerine ekildikten sonra LJ besiyerinde üreyen suşlar kullanılarak indirekt duyarlılık deneyi yapılmıştır ve sonuç alma süresi MGIT besiyerlerinin cihaza yüklenme tarihinden cihazın duyarlılık sonucunu verdiği tarihe kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır. MGIT 960 sistemi ile sonuç alınma süresine LJ besiyerindeki primer izolasyon süresi (3-4 hafta) eklenmemiştir. MODS yöntemiyle yapılan direkt duyarlılık deneyinin sonuçlarının medyan 9 günde, MGIT 960 sistemiyle yapılan indirekt duyarlılık deneyinin sonuçlarının ise medyan 8 günde elde edildiği belirtilmiştir.

Moore ve arkadaşlarının çalışmasında [11] duyarlılık sonuçlarının elde edilme süresi (medyan) MODS yöntemi, MB/Bac T sistemi ve LJ besiyerinde yapılan proporsiyon yöntemi için sırasıyla 7 gün, 22 gün ve 68 gün olarak bulunmuştur.

Ha ve arkadaşlarının çalışmasında [65] duyarlılık sonuçlarının MODS yöntemiyle 9 günde (medyan), LJ besiyerinde yapılan indirekt proporsiyon yöntemiyle ise 53 günde (medyan) alındığı belirlenmiştir.

Shah ve arkadaşlarının çalışmasında [67] ÇİD-TB vakaları MODS yöntemiyle medyan 7 gün (IQR 6-9 gün), indirekt agar proporsiyon yöntemiyle medyan 70 gün (IQR 49-96 gün) içerisinde saptandığı belirtilmiştir ($p < 0,001$).

Lazarus ve arkadaşlarının [68] çalışmasında duyarlılık sonuçlarının MODS yöntemiyle ortalama 9 günde, LJ besiyerinde yapılan proporsiyon yöntemiyle ise ortalama 42 günde elde edildiği belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda MODS yöntemiyle yapılan direkt duyarlılık deneyi sonuçlarının, duyarlılık sonuçları kültür pozitifliğinin görüldüğü gün kaydedildiğinde medyan 7-9 gün içerisinde elde edildiği belirlenmiştir. Referans olarak kullanılan standart fenotipik indirekt duyarlılık deneylerinde ise primer izolasyon süresi dikkate alındığında, duyarlılık sonuçlarının medyan 21- 71 günde elde edildiği saptanmıştır. Çalışmamızda duyarlılık sonuçları MGIT 960 sistemiyle yapılan indirekt duyarlılık deneyinde medyan 20 günde, MODS yöntemiyle yapılan direkt duyarlılık deneyinde medyan 8 günde elde edilmiştir (Tablo 5-7).

Tablo 5-7.MODS ve referans indirekt duyarlılık deneylerinde sonuçların elde edilme sürelerini karşılaştıran çalışma verileri.*

Kaynak	Yöntem	Sonuçların elde edilme süresi (medyan)
Moore ve ark. 2006 [11]	MODS (direkt)	7 gün
	MBBacT (indirekt)	22 gün
	LJ- proporsiyon (indirekt)	68 gün
Ha ve ark. 2012 [65]	MODS (direkt)	9 gün
	LJ proporsiyon (indirekt)	53 gün
Makamure ve ark 2013 [66]	MODS (direkt)	7 gün
	Mutlak konsantrasyon (indirekt)	71 gün
Shah ve ark 2011 [67]	MODS (direkt)	7 gün
	Agar proporsiyon (indirekt)	70 gün
Bu çalışma	MODS (direkt)	8 gün
	MGIT 960 (indirekt)	20 gün

*İndirekt duyarlılık deneylerinin elde edilme süresi hesaplanırken primer izolasyon süresinin hesaba katıldığı ve sonuçların medyan süre olarak veildiği çalışmalara ait veriler sunulmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmanın sonuçları, MODS yönteminin hem *M. tuberculosis* varlığının hem de ÇİD suşların saptanmasında konvansiyonel yöntemlere hızlı bir alternatif olduğunu ve kaynakları kısıtlı olan merkezler başta olmak üzere rutin olarak uygulanabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Harvey RA, Champe PA editörler. *Mikrobiyoloji*. Çev editör Anđ Ö. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.
2. Grange JM. Mycobacterium Tuberculosis; Leprosy. İçinde Greenwood D, Barer M, Slack R, Irving W editörler. *Medical Microbiology. A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control*. 8 th ed. Çin: Churchill, Livingstone, Elsevier; 2012. pp 211-21.
3. WHO. *Stop TB Partnership*. The Stop TB Strategy. Building On And Enchancing Dots to Meet the TB-related Millenium Development Goals (İnternette) 2006. Erişim 24.06.2014, http://www.who.int/tb/publications/2006/who_hm_tb_2006_368.pdf.
4. World Bank. *Independent Evaluation Group*. The Stop Tuberculosis Partnership. Global Program Review (İnternette) 2009. Erişim 17.11.2014, http://ieg.worldbank.org/Data/reports/stop_tb.pdf
5. WHO. Global Tuberculosis Report 2014 (İnternette) 2014. Erişim 14.11.2014, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1
6. Günther G. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review of current concepts and future challenges. *Clin Med*. 2014;14(3):279-85.
7. WHO. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis: policiy statement (İnternette) 2011. Erişim 09.01.2014, http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501620_eng.pdf
8. Minion J, Leung E, Menzies D, Pai M. Microscopic-observation drug susceptibility and thin layer agar assays for the detection of drug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2010;**10**: 688–98.
9. Bwanga F,Hoffner S, Haile M, Joloba ML. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: A meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* 2009;**9** :67-82.

10. Caviedes L ve ark. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis in sputum by microscopic observation of broth cultures. *J Clin microbiol* 2000;**38**(3):1203-8.
11. Moore DAJ ve ark. Microscopic-Observation Drug-Susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med* 2006; **355**(15): 1539–50.
12. Arias M ve ark. Clinical Evaluation of the Microscopic-Observation Drug-Susceptibility assay for detection of tuberculosis *Clinical Infectious Diseases* 2007; **44**:674–80.
13. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS editörler. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 12 th ed. Missouri: Mosby Elsevier; 2007.
14. Pfyffer GE. Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. İçinde Murray PR, Baron EJ editörler. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007. pp. 543-72.
15. Ryan KJ, Ray CG editörler. *Sherris Medical Microbiology*. 5th ed. New York, McGraw Hill Medical; 2010.
16. Glickman MS, Jacobs WR. Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: Dawn of a discipline. *Cell* 2001;**104**:477-85.
17. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003;**16**:463-96.
18. BoseDasgupta S, Pieters J. Striking the right balance determines TB or not TB. *Front.Immunol.* 2014;**5**:455. doi:10.3389/fimmu.2014.00455.
19. Zuniga J, Torres Garcia D, Santos Mendoza T, Rodriguez TS, Granados J, Yunis EJ. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Develop Immunol* 2012. doi:10.1155/2012/193923
20. Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host & Microbe*.2008 doi 10.1016/j.chom.2008.05.006
21. Alexander KA ve ark. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. Mungi*. *Emerg Infect Dis* 2010;**16**:1296-9.
22. Van Ingen J ve ark. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. Tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 2012;**18**:653-55.
23. WHO. Tuberculosis country profiles- Turkey (İnternette) 2014. Erişim 18.11.2014,
https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Report

s%2FG2%2FPROD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=TR&LAN=EN&ou
ttype=pdf

24. Gifford D, McKinley F, Hunter CA. A comparative study of methods of isolating *Mycobacterium Tuberculosis*. *Am J Pub Health* 1951;**41**: 164-7.
25. Thacker TC, Robbe-Austerman S, Harris B, Van Palmer M, Waters WR. Isolation of mycobacteria from clinical samples collected in the United States from 2004 to 2011. *BMC Vet Res* 2013;**9**:100-10.
26. Liu PI ve ark. Comparison of three culture media for isolation of *Mycobacterium tuberculosis*: a 6-year study. *Appl Microbiol* 1973;**26**:880-3.
27. Becton, Dickinson and Company. BBL Mycobactosel LJ medium (İnternette) 2006. Erişim 17.03.2015, <https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007477%2808%29%281006%29.pdf>
28. Remel. Dubos polysorbate 80 albunim broth (İnternette) 2014. Erişim 17.03.2015, <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/SDG/MBD/MBD%20Documents/Instructions%20For%20Use/Prepared%20Media/IFU60854.pdf>
29. Vincent V, Gutierrez MC. *Mycobacterium*: Laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. İçinde Murray PR, Baron EJ editörler. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007. pp. 573-88.
30. Becton, Dickinson and Company. MGIT TBc Identifitacion Test (İnternette) 2010. Erişim 17.03.2015, <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=11394>.
31. Hain Lifescience GmbH. GenoType Mycobacterium CM/AS (İnternette). Erişim 17.03.2015, http://www.hain-lifescience.de/uploadfiles/file/produkte/mikrobiologie/mykobakterien/MYCCM AS_eng.pdf
32. Wilson ML. Recent advances in the laboratory detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and drug resistance. *CID* 2011;**52**(11):1350–5.
33. Cepheid AB. Xpert MTB/RIF (İnternette) 2012. Erişim 05.12.2014, http://www.ipaqt.org/wp-content/uploads/2013/02/Xpert_mtb_rif_product_insert.pdf
34. Boehme CC ve ark. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010;**363**:1005-15.

35. WHO. Stop TB Partnership. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update (İnternette) 2013. Erişim 08.12.2014, <http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/WHO%20Policy%20Statement%20on%20Xpert%20MTB-RIF%202013%20pre%20publication%2022102013.pdf>
36. Woods GL, Warren NG, Inderlied CB. Susceptibility test methods: *Mycobacteria, Nocardia* and other Actinomycetes. İçinde Murray PR, Baron EJ editörler. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007. pp. 1223-36.
37. Kolya AS, Karakouss PC. Old and new tb drugs: Mechanisms of action and resistance. İçinde Cardona PJ editör. *Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance*. Rijeka, Hırvatistan: InTech (İnternette) 2012. Erişim 16.08.2014, <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drugresistance/old-and-new-tb-drugs-mechanisms-of-action-and-resistance>
38. Bryskier A, Grosset J. Antituberculosis Agents. İçinde Bryskier A editör. *Antimicrobial Agents*. Washington DC: ASM Press 2005. pp. 1088-123.
39. CLSI. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes*; Approved Standard-Second edition. CLSI document M24-A2. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
40. Drobniewski F, Rüsch Gerdes S, Hoffner S. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (EUCAST document E.DEF 8.1) Report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 1144–56.
41. Van Klingeren B, Dessens Kroon M, van der Laan T, Kremer K, van Soolingen D. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex by use of

- a high-throughput, reproducible, absolute concentration method. *J Clin Microbiol* 2007; **45**(8):2662-70.
42. Acharya S, Ghimire P, Khadka DK, Nepali S. Comparision of proportion and resistance ratio methods for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients attending national tuberculosis centre, Nepal. *SAARC J. Tuber Lung Dis HIV/AIDS* 2008;**1**:1-8
 43. WHO. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) (İnternette) 2008. Erişim 04.12.2014, http://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf
 44. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* 2005;**5**:62-71.
 45. Yadav RN ve ark. Comparative evaluation of GenoType MTBDRplus line probe assay with solid culture method in early diagnosis of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) at a tertiary care centre in India. *PLoS ONE* 2013; **8**(9): e72036. doi:10.1371/journal.pone.0072036.
 46. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 1. Art. No.: CD009593. doi:10.1002/14651858.CD009593.pub3.
 47. Arentz M, Sorensen Bess, Horne DJ, Walson JL. Systematic review of the performance of rapid rifampicin resistance testing for drug-resistant tuberculosis. *PLoS ONE* 2013; **8**(10): e76533. doi:10.1371/journal.pone.0076533.
 48. Martin A. Systematic review and meta-analysis of data on colorimetric redox indicator methods (CRI) for rapid diagnosis of drug resistant tuberculosis. (İnternette) 2009, Temmuz Erişim 17.03.2015, <http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/EGM%20Non-commercial%20culture%20methods%20SR%20CRI.pdf>
 49. Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007;**59**:175-83.

50. Çoban AY, Cihan CÇ, Uzun M, Akgüneş A, Çetinkaya E, Durupınar B. Rapid susceptibility test for *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin with rezasurin method in screw cap tubes. *J Chemother* 2006;**18**:140-3.
51. Çoban AY, Uzun M. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using the malachite green decolourisation assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;**108**:1021-3.
52. Çoban AY, Uzun M, Akgüneş, A, Durupınar B. Comparative evaluation of the microplate nitrate reductase assay and the rezasurin microtitre assay for the rapid detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;**107**:578-81.
53. Çoban AY, Tanrıverdi Çaycı Y, Deveci A, Akgüneş A, Uzun M, Durupınar B. A rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay on blood agar. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;**106**: 378-80.
54. WHO. GLI: Mycobacteriology laboratory manual. (İnternette) 2014, Nisan Erişim 17.03.2015, http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli_mycobacteriology_lab_manual_web.pdf
55. Becton, Dickinson and Company. BBL MGIT (İnternette) 2013, Temmuz Erişim 17.03.2015, <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=18341>
56. Becton, Dickinson and Company. BACTEC MGIT 960 System User's Manual (MA-0117-A).
57. Becton, Dickinson and Company. BBL MGIT AST SIRE System (İnternette) 2010, Temmuz Erişim 17.03.2015, <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=21371>
58. Universidad Peruana Cayetano Heredia. MODS user guide v12.114082008 (İnternette) 2008, Erişim 16.04.2013, http://www.modsperu.org/MODS_user_guide.pdf
59. Brady MF, Coronel J, Gilman RH, Moore DAJ. The MODS method for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis. *J. Vis. Exp.* 2008; **18**: e845, doi: 10.3791/845.
60. FDA. CDRH. Class II special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems; guidance for industry and FDA (İnternette)

2007. Rockville, MD: FDA. Erişim 17.03.2015, <http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/63l.html>
61. Reddy KP ve ark. MODS for tuberculosis screening prior to isoniazid preventive therapy in HIV-infected persons. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 988–96.
 62. Shiferaw G ve ark. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007; **45**:1093-7.
 63. Ha ve ark. Diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV-positive patients by microscopic observation drug susceptibility assay. *J Clin Microbiol* 2010;**48**:4573-9.
 64. Coronel J ve ark. Validation of microscopic observation drug susceptibility testing for rapid, direct rifampicin and isoniazid drug susceptibility testing in patients receiving tuberculosis treatment. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**:536-41.
 65. Ha ve ark. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis in VietNam. *BMC Infectious Diseases* 2012; **12**:49-60
 66. Makamure B ve ark. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of drug-resistant tuberculosis in Harare, Zimbabwe. *PLoS ONE* 2013; **8**(2): e55872. doi:10.1371/journal.pone.0055872.
 67. Shah NS ve ark. Rapid diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance by the microscopic-observation drug-susceptibility assay. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**183**:1427-33.
 68. Lazarus RP, Kalaiselvan S, John KR, Michael JS. Evaluation of the microscopic observational drug susceptibility assay for rapid and efficient diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis. *Indian J Med Microbiol* 2012;**30**:64-8.
 69. Walusimbi S, Bwanga F, De Costa A, Haile M, Joloba M, Hoffner S. Meta-analysis to compare the accuracy of GeneXpert, MODS and the WHO 2007 algorithm for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *BMC Infectious Diseases* 2013; **13**:507-20.
 70. Mello FCQ ve ark. Clinical evaluation of the microscopic observation drug susceptibility assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to isoniazid or rifampin. *J Clin Microbiol* 2007;**45**:3387-9.

71. Ejigu GS, Woldeamanuel Y, Shah NS, Gebyehu M, Sellasie A, Lemma E. Microscopic-observation drug susceptibility assay provides rapid and reliable identification of MDR-TB. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;**12**: 332-7.
72. Arentz M, Sorensen Bess, Horne DJ, Walson JL. Systematic review of the performance of rapid rifampicin resistance testing for drug-resistant tuberculosis. *PLoS ONE* 2013; **8** (10): e76533. doi:10.1371/journal.pone.0076533.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 84

Tarih : 29.01.2013

Konu : Prof.Dr. Meltem UZUN

Sayın Prof.Dr. Meltem UZUN
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İlgi :Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalının 28/12/2012 tarih ve 1311 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Doktora Öğrencisi Deniz Sertel ŞELELE'nin yürüteceği 2013/49 dosya numaralı "Tüberküloz tanısında çok ilaca direncin (MDR) belirlenmesinde microscopic-observation drug susceptibility (MODS) yönteminin değeri." başlıklı tez çalışması kurulumuzun 18/01/2013 tarihli 02 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi rica ederim.


Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Tüberküloz tanısında çok ilaca direncin (MDR) belirlenmesinde mikroskopik-observation drug susceptibility (MODS) yönteminin değeri."			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Meltem UZUN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji			
	DESTEKLEYİCİ	---			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
Yüksek Doz Araştırması		☐			
	Diğer ise belirtiniz : Deneyisel				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	14/01/2013		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☒		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	Belge Adı	☐	Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	ILAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
KARAR BİLGİLERİ	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD	
	Karar No:02	Tarih: 18/01/2013		
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görevli Prof.Dr. Meltem UZUN'nun sorumluluğunda ve Doktora Öğrencisi Deniz Sertel ŞELELE'nin yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI				19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:				Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Sevdâ ÖZEL	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

Bu karar araştırma projesinin etik açıdan değerlendirme sonucunu bildirmektedir. Klinik ilaç araştırması projeleri için, etik kurulu onayı sonrasında, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 5/a .maddesi gereğince, Sağlık Bakanlığına da başvurulması ve gerekli iznin alınması gerekmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Deniz	Soyadı	Sertel Şelale
Doğ.Yeri	Ankara	Doğ.Tar.	07.03.1985
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	19177550904
Email	dnzsertel@yahoo.com	Tel	0212 504 39 06

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2008
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Antalya Anadolu Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Klinik Araştırma Uzmanı	Neutec ArGe San. ve Tic. A.Ş.	2009-2014
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	İyi	96,25	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (22.04.2007)	77,078	80,428	84,770
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	Çok iyi
Adobe Acrobat Reader	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Nakipoğlu Y, Gümüş D, Sertel Şelale D, Küçüker Anğ M. In vitro Susceptibility of Enterococcus Strains to High Level Aminoglycoside and Heavy Metals. Mikrobiyol Bull (SCI-Expanded). 2009;43(4):545-51

Gümüş D, Sertel şelale D, Nakipoğlu Y, Küçüker Anđ M. Vankomisine Dirençli Enterokokların İzolasyonunda Deđiřik Besiyerlerinin Araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 41(4):162-167, 2011

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Sinema, tiyatro