

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBAKTERİLERİN TANISI İÇİN KLİNİK
ÖRNEKLERİN DEKONTAMİNASYON VE
KONSANTRASYONUNDA MODİFİYE PETROFF
İLE NaOH+N-ASETİL L-SİSTEİN YÖNTEMİ
TEMEL ALINARAK HAZIRLANMIŞ BİR KİTİN
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

İlkay DOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2006

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBAKTERİLERİN TANISI İÇİN KLİNİK
ÖRNEKLERİN DEKONTAMİNASYON VE
KONSANTRASYONUNDA MODİFİYE PETROFF
İLE NaOH+N-ASETİL L-SİSTEİN YÖNTEMİ
TEMEL ALINARAK HAZIRLANMIŞ BİR KİTİN
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

İlkay DOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr.İ.Yavuz SEZEN

GEBZE
2006

KABUL VE ONAY SAYFASI

KABUL VE ONAY SAYFASI

KABUL VE ONAY SAYFASI

ÖZET

Bu tez çalışmasında Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs Kalp ve Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda kullanılmakta olan modifiye Petroff örnek işleme yöntemi ile NaOH + N-Asetil L-Sistein (NaOH + NALC) yöntemi temel alınarak hazırlanmış bir dekontaminasyon ve konsantrasyon kitinin (Mycoprosafe-Salubris) etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemle hazırlanan örneklerde mikobakterilerin mikroskopla ve kültürle saptanmasındaki fark, kültür için hazırlanmış örneğin uygun pH'da olup olmadığı, kültürlerdeki kontaminasyon oranı, uygulamadaki kolaylıklar ve zorluklar karşılaştırılmıştır.

Araştırma sonuçlarına göre Toplam 200 olgu üzerinde yapılan çalışmada modifiye Petroff örnek işleme yönteminde pH ölçümleri 7,01 ile 12,50 arasında değişmekte olup ortalama $9,63 \pm 1,49$; NaOH + N-Asetil L-Sistein (NaOH + NALC) yöntemi temel alınarak hazırlanmış bir dekontaminasyon ve konsantrasyon kiti (Mycoprosafe) ile işleme yöntemindeki pH ölçümleri ise 7,07 ile 10,30 arasında değişmekte olup ortalama $7,82 \pm 0,52$ 'dir.. Modifiye Petroff yöntemi ile işlenip, Löwenstein Jensen besiyerinde üreme olan olgularda üreme günleri 5 ile 42 gün arasında değişmekte olup ortalama $20,54 \pm 7,42$ gün; Mycoprosafe ile işlenmiş olgularda ise 5 ile 38 gün arasında değişmekte olup ortalama $18,31 \pm 6,20$ gündür. Doğrudan mikroskopla incelemede örneklerin %26'sı pozitif, % 74'ü negatif saptanmıştır. Modifiye Petroff işleme yöntemi sonrası mikroskopla incelemede örneklerin % 27,5'i pozitif, % 72,5'i negatif saptanmıştır. Mycoprosafe kiti ile işleme sonrası mikroskopla incelemede örneklerin %30'u pozitif, % 70'i negatif saptanmıştır. Modifiye Petroff yöntemi ile işlenen olgularda, Löwenstein Jensen kültür besiyerinde örneklerin %62,0'ında kültür sonucu negatif, %29,0'ında kültür sonucu pozitif ve % 9,0 oranında kültür kontaminasyonu saptanmıştır. Mycoprosafe kiti ile işlenen örneklerin ise %57,0'sinde kültür sonucu negatif; %34,5'inde kültür sonucu pozitif ve % 8,5'inde kültür kontaminasyonu saptanmıştır.

Modifiye Petroff işleme yöntemi ile işlenen olguların kültür sonuçlarına göre, Modifiye Petroff işleme yöntemi sonrası mikroskopla incelemenin değerlendirilmesinde; Duyarlılık (%77,4), Özgüllük (%84,6), Pozitif Kestirim Değeri (%89,8), Negatif Kestirim Değeri (%97,6) saptanmıştır

Mycoprosafe kiti kullanılan işleme yönteminde olguların kültür sonuçlarına göre Mycoprosafe kiti ile işleme yöntemi sonrası mikroskopla incelemenin değerlendirilmesinde; Duyarlılık (% 84,5), Özgüllük (%86,3), Pozitif Kestirim Değeri (%91,9), Negatif Kestirim Değeri (%97,5) saptanmıştır.

SUMMARY

This thesis study was under taken at the Ministry of Health Süreyyapaşa Respiratory Research Hospital Bacteriology Laboratory . The two methods compared are the modified Petroff (uses homogeneous and decontamination method) method and the Mycoprosafe-Salubris kit which uses NaOH + N-Asetil L-Cystein (NaOH + NALC) method as its basis for decontamination and concentration. Using both method to prepare the samples, the variation of the mycobacteria in culture and microscope; prepared sample for culture medium , what is its pH value, if it has appropriate pH value or not, contamination percentage in the cultures,ease or difficulty of the treatment were all studied.

There was a total of 200 specimens used in the research study. The pH values obtained using the modified Petroff method was a range from 7.01 to 12.50 with an average value of $9,63 \pm 1,49$. The pH values using the Mycoprosafe kit was a range from 7.07 to 10.30 with an average value of $7,82 \pm 0,52$. Löwenstein Jensen culture medium that has been homogenized and decontaminated with modified Petroff method had Mycobacteria that reproduce in a time of 5 to 42 days, averaging $20,54 \pm 7,42$ day. Culture medium that has been treated with Mycoprosafe kit had Mycobacteria that reproduce in 5to 38 time period, average of $18,31 \pm 6,20$ days. Directly studying the specimens with a microscope, the results were 26 % positive (ARB positive), 74 % negative (ARB negative). Once treated with modified Petroff, the microscopic specimen results were 27.5 % positive and 72.5 % negative. Using Mycoprosafe kit for treatment, the microscopic results of the specimens were 30% positive and 70% negative. Löwenstein Jensen cultures that were treated with modified Petroff and then samples grown showed 62% culture results negative and 29% culture results positive and 9% culture contamination. Culture treated with Mycoprosafe kit then used with the samples showed 57% culture results as negative, 34.5% culture results as positive and 8.5% culture contamination.

Samples that were obtained using modified Petroff method and according to their culture results, after modified Petroff method was used, the microscopic

observations were as follows; sensitivity 77.4 %, specificity 84.6 %, positive predictive value 89.8 %, negative predictive value 97.6 %.

Samples that were obtained using Mycoprosafe kit and according to their culture results, once Mycoprosafe kit was used then the microscopic observation were as follows; sensitivity 84.5 %, specificity 86.3 %, positive predictive value 91.9 %, negative predictive value 97.5 %.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bana yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN'e,

Araştırma konumun seçilmesi, uygulanması ve tez yazım aşamasındaki katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Tanıl KOCAGÖZ'e,

Laboratuar çalışmalarında ve Yüksek lisans öğrenimim boyunca yardımlarını esirgemeyen Dr. Mualla PARTAL'a ve değerli mesai arkadaşlarıma,

Laboratuar çalışmalarım için sağladıkları olanaklardan ve katkılarından dolayı Salubris A.Ş yetkililerine ve değerli arkadaşım Erkan MOZİOĞLU'na,

Tezimin yazım aşamasında yardımcı olan Salih SİVRİ, İlhan SİVRİ, Hülya TUTUŞ ve Ebru ÖZTÜRK'e,

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca manevi olarak her zaman yanımda olan aileme ve sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ	1
2.KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR	3
2.1. Tüberkülozun Tarihçesi	3
2.2. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	5
2.2.1. Hücre Duvarı Özellikleri	7
2.2.2. Mikobakteriyel Antijenler	9
2.2.3. Üreme Özellikleri	12
2.2.4. Sınıflandırma	13
2.2.5. Çevre Koşullarına Dayanıklılıkları	16
2.3. Tüberküloz Bakterilerinin Enfeksiyonları	16
2.3.1. Primer Tüberküloz	17
2.3.2. Sekonder Tüberküloz (Yetişkin Tüberkülozu)	18
2.3.3. Ekstrapulmoner (Akciğer Dışı) Tüberküloz	19
2.4. Tanı Yöntemleri	24
2.4.1. Klinik Örneklerin Alınma ve Laboratuvara Gönderilme Koşulları	25
2.4.2. Mikroskopik İnceleme	29
2.4.2.1. Mikroskopik İnceleme İçin Yayma Yapılması	29
2.4.2.2. Aside Dirençli Boyama Yöntemleri	30

2.4.3. Homojenizasyon ve Dekontaminasyon Yöntemleri	35
2.4.3.1. Petroff'un NaOH Yöntemi	41
2.4.3.2. Dünya Sağlık Örgütü' nün Önerdiği Modifiye Petroff Yöntemi	42
2.4.3.3. NaOH Yöntemi (%2- 4 NaOH)	43
2.4.3.4. N-Asetil-L-Sistein NaOH (NALC-NaOH) Yöntemi	46
2.4.3.5. Zefiran-Trisodyum Fosfat (Z-TSP) Yöntemi	50
2.4.3.6. Sülfürik Asit Yöntemi	52
2.4.3.7. Oksalik Asit Yöntemi	52
2.4.3.8. Setilpiridinyum Klorid-Sodyum Klorid Yöntemi	54
2.4.4. Geleneksel Kültür Yöntemleri	58
2.4.5. Kültür Yapılmadan Basil Saptanması	63
2.5. Epidemiyoloji ve Korunma	65
3.GEREÇ VE YÖNTEM	69
3.1. Araç - Gereçler	69
3.1.1. Kullanılan Besiyeri, Kimyasallar ve Kitler	69
3.1.2. Araçlar	69
3.1.3. Cam ve Diğer Malzemeler	70
3.2. Örneklerin Toplanması ve Yöntem	70
3.3. Ziehl – Neelsen (EZN) Boyama Yöntemi	71
3.3.1. Kullanılan Boya Eriyikleri ve Renksizleştirme İşleminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	71
3.3.2. Boyama Yönteminin Uygulanması	71
3.4. Homojenizasyon ve Dekontaminasyon Yöntemleri	72
3.4.1. Modifiye Petroff NaOH Dekontaminasyon ve Homojenizasyon Yöntemi	73
3.4.1.1. Kullanılan Çözeltilerin İçeriği ve Hazırlanması	73
3.4.1.2. Balgam, Bronkoalveolar Lavaj (BAL), Açlık Mide Sıvısı ve Transbronşiyal Aspiratlarda Yöntemin Uygulanması	73
3.4.1.3. İdrar Örneklerinde Yöntemin Uygulanması	74

3.4.2. Mycoprosafe Kiti ile Dekontaminasyon ve Konsantrasyon	74
3.4.2.1. Balgam, Bronkoalveolar Lavaj (BAL), Açlık Mide Sıvısı ve Transbronşiyal Aspiratlarda Uygulama	75
3.5. pH Ölçümü	76
3.6. Homojenizasyon-Dekontaminasyon Sonrası İşlenmiş Örneklerden EZN Boyama	76
3.7. Löwenstein – Jensen Kültür Besiyerine Ekim	76
3.8. İstatistiksel Hesaplamalar	77
4.BULGULAR	78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	94
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	111

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>M. tuberculosis</i>	: Mycobacterium tuberculosis
EZN	: Erhlich-Ziehl-Neelsen
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
OT	: Old Tuberculin
PPD	: Purified Protein Derivative
PAS	: Para Amino Salisilik Asit
INH	: İzoniazid
EMB	: Etambütol
ARB	: Aside Dirençli Basil
AIDS	: Acquired Immun Deficiency Sendrom
µm	: Mikrometre
NAMA	: N-Asetil Muramik Asit
NGMA	: N- Glikolil Muramik Asit
NAGA	: N-Asetil Glikozamin
LAM	: Lipoarabinomannan
MOTT	: Mycobacterium Other Than Tuberculosis (Atipik mikobakteriler veya Tüberküloz dışı mikobakteriler)
IFN	: İnterferon
GTA	: Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık
PNL	: Polimorf Nüveli Lökositler
HIV	: Human İmmunodeficiency Virüs
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
PCR	: Polymerase Chain Reaction
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
BAL	: Bronko Alveolar Lavaj
MAC	: Mycobacterium avium complex
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
CDC	: Centers For Disease Control
NALC	: N-Asetil-L-Sistein

Z-TSP : Zefiran-Trisodyum Fosfat
CPC : Setilpridinyum Klorid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Balgam örneğinden hazırlanıp, EZN boyama yöntemiyle boyanmış aside dirençli basillerin ışık mikroskobunda görünümü	7
2.2. Mikobakterilerin hücre duvar yapısı	8
2.3. Löwenstein Jensen besiyerinde <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kolonilerinin uzaktan görünümü	62
2.4. Löwenstein-Jensen besiyerinde <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kolonilerinin yakından görünümü	63

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. MOTT'in sınıflandırılması ve en sık neden oldukları hastalıklar	15
2.2. Doğrudan boyalı yaymaların değerlendirilmesi ve rapor edilmesi	34
2.3. NALC-NaOH çözeltisinin hazırlanması	47
2.4. Homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri	56
2.5. Kültür pozitifliğinin değerlendirilmesi	63
3.1. Doğrudan boyalı preparatların EZN yöntemine göre değerlendirilmesi ve rapor edilmesi	72
4.1. Olguların doğrudan, işleme sonrası mikroskopik inceleme ve kültür besiyerinde üreme olup olmama durumuna göre değerlendirilmesi	78
4.2. Petroff ve Mycoprosafe sonrası mikroskopik inceleme sonuçlarının değerlendirilmesi	81
4.3. Petroff ve Mycoprosafe sonrası ölçülen pH sonuçlarının değerlendirilmesi	82
4.4. Petroff sonrası ölçülen pH değeri aralıklarına göre kültür sonuçları ve ortalama üreme sürelerinin dağılımı	84
4.5. Mycoprosafe sonrası ölçülen pH değeri aralıklarına göre kültür sonuçları ve ortalama üreme sürelerinin dağılımı	85
4.6. Petroff ve Mycoprosafe ile işlenmiş örneklerin kültür sonuçlarının dağılımları	86
4.7. Petroff ve Mycoprosafe ile işlenmiş örneklerin kültür pozitifliği ve kültür negatifliğine göre dağılımları	86
4.8. Petroff ve Mycoprosafe ile işlenmiş örneklerin kültürlerinin her ikisinde de kültürü pozitif olan olgulara göre üreme sürelerinin (gün) değerlendirilmesi	87
4.9. Petroff ve Mycoprosafe ile işlenmiş örneklerde kültür pozitif olguların kültür pozitifliğinin derecesinin değerlendirilmesi	87
4.10. Doğrudan, Petroff sonrası ve Mycoprosafe sonrası mikroskopik incelemeler ile Petroff ve Mycoprosafe kültür sonuçlarının dağılımı	88

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik	Sayfa
4.1. Olguların doğrudan mikroskopik inceleme sonuçlarının dağılımı	79
4.2. Petroff ve Mycoprosafe ile örneklerin işlenmesi sonrası mikroskopik inceleme sonuçlarının dağılımları	80
4.3. Petroff ve Mycoprosafe kit kullanılan yöntemlere göre kültür sonuçlarının dağılımları	80
4.4. Petroff ve Mycoprosafe ile işleme sonrası örneklerden ölçülen pH değerlerinin karşılaştırılması	83

1.GİRİŞ

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks diye tanımlanmış bir grup mikobakteri (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* ve *M. canettii*) tarafından oluşturulan kronik granülomatöz bir enfeksiyon hastalığı olup, olguların % 98'inden *M. tuberculosis* sorumludur. Tüberküloz basilleri tüm organlarda hastalık yapabilir. Hastalığın en sık görüldüğü organ akciğerlerdir (%85) (Kılıçarslan., 2002; Haas., 2000). Günümüzde tüberküloz olgularında en sık izole edilen tür *M. tuberculosis*' dir (Kıyan., 1999).

Tüberküloz dünyada sağlık alanındaki gelişmelere rağmen çok önemli bir halk sağlığı problemi olarak güncelliğini korumaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre; dünya nüfusunun üçte biri yani yaklaşık 2 milyar kişi *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektidir. Basili taşıyan insanların yaklaşık 20 milyonu aktif tüberkülozlidir. Yılda 8 milyon yeni olgusu olan tüberkülozdan 3 milyondan fazla insan ölmektedir (Metchock et al., 1999; Özkara ve ark., 2003).

Tüberküloz tanısı için en sık olarak incelenen balgam gibi örneklerde tüberküloz basili dışında çok sayıda mikroorganizma bulunmaktadır. Bunlar tüberküloz basilinden çok daha hızlı üredikleri için kültür besiyerlerinde tüberküloz basilinin üretilerek saptanmasını engellemektedir. Bu nedenle kültür besiyerlerine ekim yapılmadan önce bu bakterilerin seçici olarak öldürülmesi (dekontamine edilmesi) gerekmektedir. Bu amaçla yaygın olarak NaOH kullanılmaktadır. NaOH ile dekontaminasyon sonrası pH'ın nötralize edilmesi gerekir. Bu amaçla Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs Kalp ve Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma hastanesi Bakterioloji Laboratuvarı'nda olduğu gibi yaygın olarak HCl kullanılmaktadır. Modifiye Petroff yöntemi adı verilen bu yöntemin bazı kısıtlı yanları ve uygulama zorlukları bulunmaktadır. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü ve bilim çevresi örnek işlenmesi için NaOH + N-Asetil L-Sistein (NaOH + NALC) yönteminin kullanılmasını önermektedir. Bu yöntemin uygulanması ise yoğun çalışan laboratuvarlarda malzemelerin hazırlanmasının zorluğu nedeni ile yaygın olarak gerçekleştirilememektedir.

Bu tez çalışmasında Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs Kalp ve Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda kullanılmakta olan modifiye Petroff örnek işleme yöntemi ile NaOH + N-Asetil L-Sistein (NaOH + NALC) yöntemi temel alınarak hazırlanmış bir dekontaminasyon ve konsantrasyon kitinin (Mycoprosafe-Salubris) etkinliklerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Her iki yöntemle hazırlanan örneklerde mikobakterilerin mikroskopla ve kültürle belirlenmesindeki fark, kültür için hazırlanmış örneğin uygun pH'da olup olmadığı, kültürlerdeki kontaminasyon oranı, uygulamadaki kolaylıklar ve zorluklar karşılaştırılmıştır.

2. KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR

2.1. Tüberkülozun Tarihçesi

Tüberküloz, insanlık tarihinin bilinen en eski ve en çok korkulan hastalıklarından birisidir. Bakterinin paleolitik çağda, insanları enfekte etmeden önce hayvanlar arasında yaygın olarak bulunduğu düşünülmektedir (Kıyan., 1999). İnsanoğlunun M.Ö. 8000 yıllarında ilk yerleşik topluluklar oluşturması ve sığırları evcilleştirmesiyle mikobakterilerle tanıştıkları tahmin edilmektedir. Etkenin enfekte hayvanın etlerinin yenmesi veya kontamine sütlerin içilmesiyle insanlara geçtiği, toplu yaşama geçişle birlikte yayılım gösterdiği düşünülmektedir. Almanya da M.Ö. 5000 yıllarına ait insan iskeletlerinde asit ve alkole dirençli basiller bulunmuştur. M.Ö. 3500-3000 yıllarına ait Mısır mumyaları üzerinde yapılan incelemelerde tüberkülozu düşündüren kemik lezyonlarına (Pott hastalığı) ve aside dirençli basillere rastlanmıştır (Kocabaş., 2002).

Hastalığın ilk belirtileri Hipokrat (M.Ö. 460-377) tarafından tanımlanmıştır. Hipokrat bu hastalık için erime, tükenme anlamına gelen “ phtisis ” deyimini kullanmıştır.

M.S. 2. yüzyılda Galen, phtisis için tedavi önerilerinde bulunmuştur. Bu öneriler; istirahat, öksürüğün kesilmesi, göğüs yakıları, venden kan alımı, sülük uygulamasıdır (Kocabaş., 2002).

Tüberküloz ile ilgili klinik ve patolojik gözlemler; hastalıktan ölen kişilerin otopsi incelemelerinde , akciğerlerinde kaviter lezyonlar olduğunu bildiren A. Vesalius (M.S. 1478) ile başlamıştır. F.S. Sylvius (1614-1672) tarafından tüberküller tanımlanmıştır. Robert Marton 1689’da bu hastalık için bitip tükenme manasına gelen verem tabirini kullanmıştır.

İlk kez hastalığın bulaşıcı karakterde olabileceği 16. yüzyıl başlarında Fracastorius tarafından ileri sürülmüştür. 1865’ te Willemin tüberkülozlu hastaların

kavitelerinden alınan örneği inoküle ettiği tavşanlarda, tüberküloz geliştiğini göstermiştir (Kocabaş., 2002; Kıyan., 1999).

Tüberküloz tarihinin en önemli dönüm noktası, 24 Mart 1882’ de Robert Koch’ un Berlin Fizyoloji Derneği’ nde tüberküloz basilini keşfettiğini bildirmesidir. Robert Koch 1884’ de tüberküloz basilini klinik örneklerden izole ettikten sonra saf kültürünü yapmış, deneysel olarak hayvanlarda hastalık oluşturmuş ve enfekte hayvanlardan bakteriyi tekrar üreterek Koch postulası’ nı tanımlamıştır. Koch 1890 yılında tüberküloz bakterisinin ekstresi olan “ old tüberkülin ” ile hastalığın özel bağışıklık ve allerjisini ortaya koymuştur (Kıyan., 1999).

1896 yılında sığır tüberküloz basili *M. bovis* ayrı bir tür olarak Th. Smith tarafından bulunmuştur. 1937 yılında tarla farelerinde fare tüberküloz basili *M. microti* İngilizler tarafından izole edilmiştir (Saniç ve Çoban., 1999). *M. africanum*, ilk olarak 1968’ de Senegalli bir hastadan izole edilmiştir. Son tür *M. canettii* ise 1997 yılında Somali’den izole edilmiştir (Frothingham et al., 1999)

Paul Ehrlich 1882 yılında tüberküloz basilinin aside dirençli olduğunu keşfetmiştir. Ziehl ve Neelsen adıyla anılan yöntemde ufak değişiklikler yaparak, EZN (Ehrlich-Ziehl-Neelsen) boyama yöntemini geliştirmiştir (Bilgehan., 1995).

1902 yılında Dorset, yumurta bazlı besiyerini ilk kez basilin kültüründe kullanmıştır. Löwenstein 1930’ lu yıllarda Löwenstein Jensen besiyerini geliştirmiştir (Bilgehan., 1995).

1921 yılında Fransız araştırmacılar Albert Calmette ve Camile Guérin sığır tüberküloz basilini 230 kez pasaj yaparak ilk tüberküloz aşısı olan BCG’yi (Bacillus Calmette- Guérin’i) geliştirmişlerdir. Seibert ve Glenn 1939 yılında Old Tüberkülin’in (Eski tüberkülin’in) saflaştırılmasıyla elde edilen tüberkülin’in saflaştırılmış protein türevi PPD’yi (Purified Protein Derivative’i) hazırlamıştır. Böylece hastalığın varlığı belirlenmeye başlanmıştır (Kıyan, 1999; Bilgehan., 1995).

1944 yılında S.A. Waksman ve meslektaşı A. Schatz ilk tüberküloz ilacı olan Streptomisin’i bulmuşlardır. Bu nedenle 1944 yılı tıp tarihine “ mucize yılı ” (annus

mirabilis) olarak geçmiştir (Saniç ve Çoban., 1999). 1946 yılında İskandinavyalı Jorgen Lergen Lehmann PAS (paraamino salisilik asit)'i buluşu tüberküloz tedavisinde yeni bir döneme öncülük etmiştir. Fakat tüberküloz ilaçlarının tek başlarına kullanımı sonucu 1 ay gibi kısa sürede direnç gelişimine yol açmalarının anlaşılması üzerine yeni ilaç bulma çalışmaları hızlanmıştır. 1952 yılında Robitzek ve Selikof PAS' e göre daha ucuz ve yan etkisi daha az alan INH (izoniazid)'i buluşundan sonra hastalık kombine tedavi ile 18-24 ayda tedavi edilebilir hale gelmiştir (Bilgehan., 1995). 1960 yılında bulunan EMB (etambutol), PAS' in yan etkileri nedeniyle oluşan tedaviye uyumsuzluk sorununu, bu ilacın yerini alarak önemli ölçüde azaltmıştır. 1952-1960 yılları arasında “Pirazinamid, Sikloserin, Capreomisin, Viomisin, Kanamisin” gibi ilaçların bulunmasıyla kombine tüberküloz tedavisine farklı seçenekler kazandırılmıştır. 1966 yılında Rifampisin' in bulunmasıyla devam eden çalışmalar, 1972' lerden itibaren tüberküloz tedavisinde devrim sayılabilecek önemli gelişmeleri ortaya çıkarmıştır. Böylece tüberküloz, ilaçların yeni bir yaklaşım ve kombine tedavi uygulaması ile 6 ayda tedavi edilebilir hale gelmiştir (Kocabaş., 1991).

2. 2. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Mycobacterium, Mycobacteriaceae ailesinin tek cinsidir. Mycobacterium türlerinin DNA'sı %62-70 G+C oranı ile diğer mikolik asit üreten bakterilerle, Nocardia (G+C: %60-69), Rhodococcus (G+C: %51-59), Corynebacterium (G+C: %51-59) ile benzerlik gösterir (Metchock et al., 1999). Bu ortak özellikleri nedeniyle Corynebacterium, Nocardia ve Mycobacterium'lar CNM grubu olarak anılırlar da, mikobakteriler “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology” kitabının 1986 baskısında ayrı bir bölüm içinde ele alınmıştır (Kıyan., 1999; Wayne et al., 1986; Koneman et al., 1997).

Mikobakterilerin sınıflandırılması;

Alem : Prokaryot (Bakteri)

Bölüm : Firmicutes

Sınıf : Actinobacteria

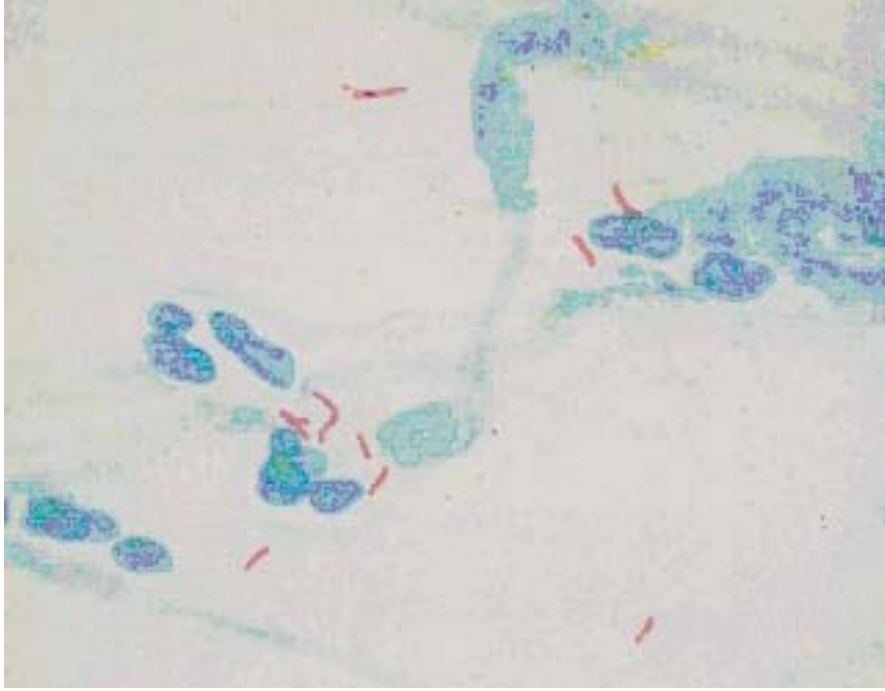
Takım : Actinomycetales

Aile : Mycobacteriaceae
 Cins : Mycobacterium (Köksal ve Yaman., 2003)

Mycobacterium cinsinin temel özelliği; yavaş üremeleri ve ARB (aside dirençli basil) olmalarıdır (Kocabaş, 2002). Hücre duvar yapılarında bol miktarda lipid bulunduğu için boyayı zor alırlar, ancak bir kez boyandıkları zaman boyayı kolay kolay bırakmaz ve asit-alkol karışımı ile yapılan renksizleştirme işlemine direnç gösterirler. Bu nedenle aside dirençli basiller olarak anılırlar (Kıyan., 1999).

Mikobakteriler; saprofit, zorunlu parazit ve ara formlardaki değişik türleri içermekte olup, bugüne kadar 147 türü tanımlanmıştır (http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria_genus/bacteria_genus_mycobacterium.html, 2005). Klinik açıdan bakıldığı zaman *M. tuberculosis*, hastalık yapma derecesine ve halk sağlığı ile yakın ilişkisi sebebiyle bu cinsin en önemli üyesidir. Son yıllarda özellikle AIDS (Acquired Immun Deficiency Sendrom) hastalığının ortaya çıkışıyla birlikte, diğer bazı mikobakteri türlerinin de (*M. avium* kompleks, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*) fırsatçı enfeksiyonlarda klinik önemi olabileceği anlaşılmıştır (Metchock et al., 1999).

Mikobakteriler; zorunlu aerob, sporsuz, 0,2-0,6 µm eninde ve 1-10 µm boyunda, hareketsiz kapsülsüz, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Bazen filamentöz, misel benzeri yapılarda görülmekle birlikte genellikle basil veya kokoid şekildedirler (Metchock et al., 1999; Leung., 1999; Roberts et al., 1991). Balgam ve diğer klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda Şekil 2.1 de görüldüğü gibi tek ya da ikili üçlü gruplar halinde, birbirlerine paralel veya X, V, L harfleri oluşturacak biçimde bir arada görülebilirler. Kültürden hazırlanan perparatlarda ise çoğu kez büyük kümeler oluşturdukları gözlemlenmiştir. Eski kültürlerde ve uygunsuz koşullarda üreyen bakteriler daha uzun, ipliksi ya da daha kısa hatta koklara benzer değişik şekillerde görülebilmektedir (Saniç ve Çoban., 1999).



Şekil 2.1. Balgam örneğinden hazırlanıp, EZN boyama yöntemiyle boyanmış aside dirençli basillerin ışık mikroskopunda görünümü (<http://www.goshen.edu/bio/Biol206/Biol206LabProject/tricia/tbbio.html>., 2005)

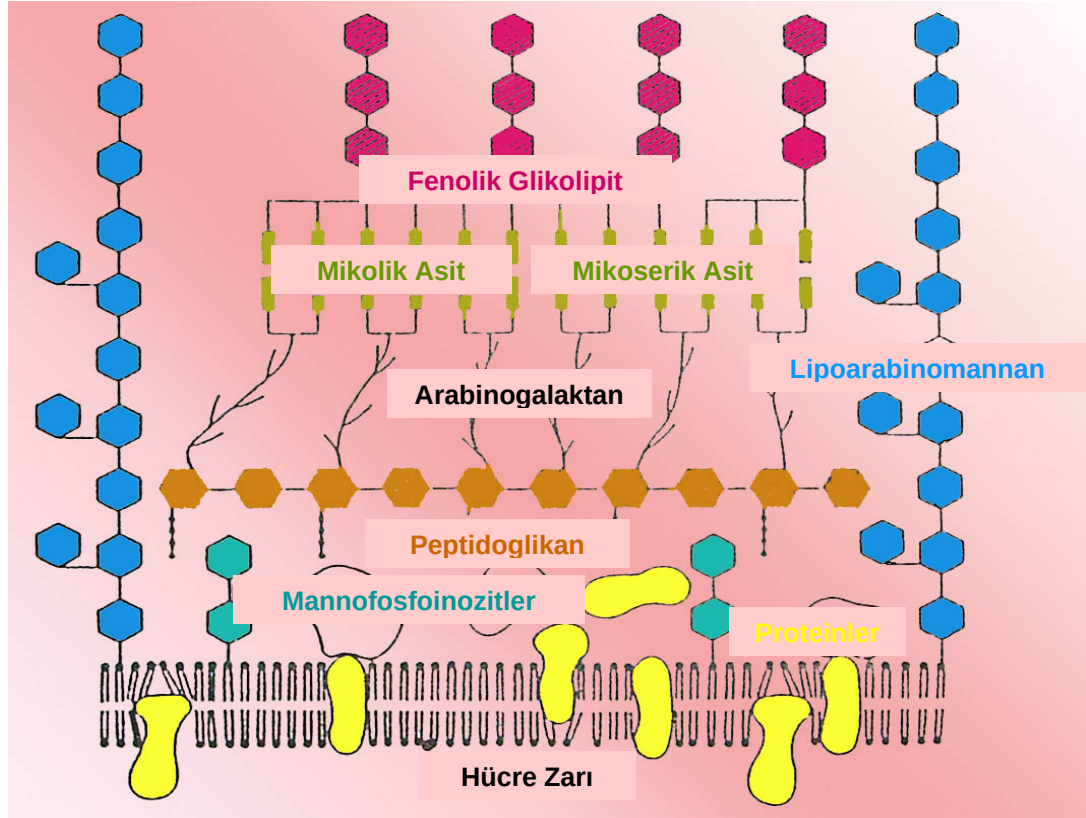
2.2.1. Hücre Duvarı Özellikleri

Mikobakterilerin plazma membranları diğer bakterilerin plazma membranları ile benzer özelliklere sahiptir. Tipik olarak protein ve fosfolipitlerden oluşan çift katmanlı bir yapıdadır (Köksal ve Yaman., 2003).

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı alışlagelmiş Gram negatif veya Gram pozitif bakteri hücre duvarlarından oldukça farklı ve karmaşıktır (Köksal ve Yaman., 2003). Biyokimyasal çalışmalara göre; mikobakteriyel hücre duvar iskeletinin temel yapısı 3 makromolekülden oluşmaktadır. Bunlar; Peptidoglikanlar, arabinogalaktanlar ve mikolik asitlerdir (Iseman., 2002). Mikobakterilerin hücre duvarının en önemli özelliği klasik bakteriyel peptidoglikan tabakadan farklı olarak bu tabadaka N-asetil muramik asit (NAMA) yerine N glikolil muramik asit (NGMA) bulunmasıdır. Bu tabaka N-asetil-glikozamin (NAGA) ve NGMA'nın beta glikozid ve

fosfodiester bağlarla bağlanmasından oluşan bir heteropolimer yapıdır (Köksal ve Yaman., 2003).

Mikobakterilerin hücre duvar yapısını gösteren çizim Şekil 2.2' de verilmiştir.



Şekil 2.2. Mikobakterilerin hücre duvar yapısı (Gaylord and Brennan., 1987).

Peptidoglikan tabakanın dışında üst üste üç katman gibi görünen ayrı bir yapı bulunmaktadır. Bu yapının temelinde mikolik asit ile çevrili arabinogalaktan polisakkarit yapısı bulunur (Kıyan., 1999; Çalışır ve ark., 1998). Mikolik asitler hücre duvarının kalınlığından ve büyük oranda hücrenin aside dirençli boyanmasından sorumludur (Kocabaş., 1991). LAM (lipoarabinomannan)'ın mikobakteriyel virülans faktörü olarak yer alması bu yapısal modelin en önemli özellikleri arasındadır (Iseman., 2002). Mikolik asit ile çevrili arabinogalaktan polisakkarit yapının arasında bakterinin virulansı ile ilgili olduğu bilinen maddeler vardır. Bunlardan biri kord faktör'dür (Saniç ve Çoban., 1999; Kocabaş., 1991). Mikolik asitler, trehalose gibi şekerlerle bağlanarak kord faktör oluşturmaktadır (Kocabaş., 1991). Hücre duvarında ayrıca polianyonik glikolipitler, fosfolipitler,

sülfolipitler ve peptidoglikolipitler bulunur (Saniç ve Çoban., 1999; Lefford., 1983). Hücre çeperi lipidlerden oldukça zengindir. Hücre kuru ağırlığının %60'ını lipidler oluşturmaktadır. En dışta bulunan polipeptitler duvar ağırlığının %15'ini oluştururlar (Kıyan., 1999).

2.2.2. Mikobakteriyel Antijenler

Mikobakterilerin çok sayıda antijenik yapısı mevcuttur. Bu antijenik yapılar fiziksel ve fonksiyonel özelliklerine göre farklılık gösteren pek çok lipid, protein ve polisakkaritten oluşur. Bu antijenlerin bir kısmı sitoplazmada, bir kısmı da hücre duvarında lipidlere bağlı olarak bulunmaktadır. Mikobakteriyel antijenlerin bağışıklık sistemini baskılama, granülom oluşumuna yol açma, makrofaj aktivasyonu, konakçı toksisitesi oluşturma gibi çok sayıda etkileri vardır. Mikobakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlarda esas olarak hücresel bağışıklık sistemi rol oynar. Burada proteinler anahtar immünojenler olarak kabul edilirler. Bu konudaki yapılacak çalışmaların tüberküloz tanısında daha etkili yöntemlerin geliştirilmesine ve tüberkülozla savaşta daha güçlü aşıların bulunmasına yardımcı olacağı ve tüberküloz patogenezinin daha iyi anlaşılabilceği düşünülmektedir (Kıyan., 1999; Saniç ve Çoban., 1999).

Mikobakteriyel proteinler

Eski tüberkülin (Old tuberculin-OT): İlk kez Koch tarafından elde edilmiştir. *M. tuberculosis* ve *M. bovis*'in sıvı besiyerlerinde 37°C'de 6-8 hafta üretilmesini, ilk hacminin 1/10'u kalıncaya kadar ısıyla yoğunlaştırılması ve filtrasyonla sterilize edilmesi sonucu elde edilen saf olmayan bir üründür. OT'in enfekte kişilerde, basille karşılaşmamış olanlara nazaran daha çabuk ve daha belirgin reaksiyon oluşturduğu görülmüş ve tüberküloz enfeksiyonunun tanısında deri-içi cilt testi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Fakat OT'in besiyerinden kaynaklanan farklı komponentleri içermesi sebebiyle bu aktif tüberküloproteinin saflaştırılmasına gerek duyulmuştur. Böylece PPD geliştirilmiştir (Kıyan., 1999; Bilgehan., 1995).

Saflaştırılmış protein türevi (purified protein derivate: PPD): 1941 yılında ilk kez Seibert ve Glenn tarafından tanımlanmıştır. Yapay besiyerinde hazırlanmış OT'in sülfat ve aseton ile çöktürülmesi sonucu elde edilmiş kısmen saf bir üründür.

Hazırlanması uzun bir inkübasyon dönemini, 100°C'e kadar ısıtarak öldürme ve proteinlerin çöktürülmesi basamaklarını içerir. Sonraki yıllarda Stanford ve arkadaşları “yeni tüberkülinler” adı altında, PPD'ye göre türe özgü antijenler bakımından çok daha zengin olan ve deri testi için daha uygun olan protein türevleri hazırlamışlardır (Kıyan., 1999; Bilgehan., 1995).

Dünya Sağlık Örgütü 0,1 ml. çözeltide 5 tüberkülin ünitesi (TÜ) dozunda PPD veya 0,0001 mg PPD-S proteini bulunmasını önermektedir. Deri testi, sol ön kolun üst iç kısmına yapılır Tüberkülin deri testi sonuçları, enjeksiyondan 48-72 saat sonunda oluşan sertleşme bölgesinin ölçülmesi ile değerlendirilir (Dunlap et al., 2000). Bağışıklıkla ilgili oluşan bu reaksiyon, gecikmiş tipte aşırı duyarlılık (Tip IV) olarak isimlendirilir. Bu testin duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür. Çünkü yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflik oranları oldukça yüksektir. Yalancı pozitifliğe neden olan en önemli faktörler; BCG aşılması ve MOTT (Mycobacterium Other Than Tuberculosis, atipik mikobakteriler veya tüberküloz dışı mikobakteriler) ile karşılaşmadır. Sonuç olarak tüberkülozda dikkatle yorumlanması gereken bir testtir (Kılınç., 2003).

Antijen 5, Antijen 6, Antijen 60: Saflaştırılmış sitoplazmik proteinler olup, bakteriye karşı oluşan hümmoral bağışıklık yanıtı göstermek amacıyla kullanılmaktadır (Maes., 1991).

65 kD Protein: Saflaştırılmış mikobakteriyel bir antijendir. Mikobakterilerin değişik türlerinde varlığı gösterilmiştir. Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda, çok güçlü gecikmiş tip aşırı duyarlılığa (GTA'a) yol açtıkları bulunmuştur. Tüberküloz ve lepralı hastalarda bu antijene karşı oluşan antikorlar ve duyarlı T hücrelerinin varlığı gösterilmiştir (Kıyan., 1999; Orme et al., 1993; Mehra et al., 1996).

Antijen 85 Kompleksi: Salgısal tipte olup, mikobakteriyel enfeksiyondan sonra bağışıklık yanıtında rolü olduğu düşünülmektedir. Özellikle akciğer tüberkülozlu hastaların çoğunda güçlü bir antikor yanıtı oluşturan 88 kD'luk bu antijen belirlenmiştir. Bu antijen T hücre aktivasyonunu ve buna bağlı olarak makrofaj aktivasyonunu bozar, deri testi cevabını engeller ve enfeksiyon bölgesinde

makrofajların savunma yapmasını önler (Saniç ve Çoban., 1999; Kıyan., 1999; Iseman., 2002).

Mikobakteriyel polisakkaritler:

Arabinoz, galaktoz ve mannoz içeren polisakkarit I molekülleri geç tip aşırı duyarlılık oluşturabilirler, polisakkarit II molekülleri ise geç tip aşırı duyarlılık oluşturmazlar, fakat serolojik aktivite gösterirler (Brooks et al., 2001; Freedman et al., 1996; Julian et al., 1997).

Mikobakteriyel Lipitler:

Mikobakteriyel lipitler sitoplazmada bulunmalarına rağmen esas olarak hücre duvarında yer alırlar. Hücre duvarında; mikolik asitler, fosfolipitler, Wax D, mikosidler ve diğer glikolipitlerin tümü yer alır (Saniç ve Çoban., 1999).

Hücre duvarının yüksek lipit içeriği; hücre içi ve hücre dışı çevredeki asidik ve alkali bileşiklerin öldürücü etkilerine karşı koyma, aside dirençli boyanma gibi özellikleri sağlar (Sevinç., 2004).

Trehaloz glikolipitler (Kord faktör): Tüberküloz basiline küme oluşturma yeteneği kazandırdığı için kord faktör olarak da bilinir. Sistemik toksisite, antitümör aktivite, granülom oluşumunu uyarma, in vitro olarak polimorf nüveli lökositlerin (PNL) göçünü önleme, komplemanı alternatif yoldan aktive etme gibi etkileri vardır. Farelerde karakteristik bir toksisiteye sahiptir (Kıyan., 1999; Saniç ve Çoban., 1999; Brooks et al., 2001).

Sülfolipitler: Sülfür içeren glikolipitlerdir. Makrofajda, fagozom-lizozom birleşmesini engeller ve bakteriyi lizozomal enzimlerin etkisinden koruyarak basilin parçalanmasını ve konakçı tarafından yok edilmesini önlerler. Böylece bakterinin hücre içi yaşamını sürdürmesinde rol oynarlar. Kord faktöre sinerjik etki yaparlar. Yapılan çalışmalarda deney hayvanlarına tek başına verildiğinde kord faktörün toksik etkisini arttırdığı görülmüştür (Saniç ve Çoban., 1999; Kıyan., 1999; Gedikoğlu., 1997).

Fosfatidiler: Epitel hücrelerin dev hücrelere dönüşmesine neden olarak, tüberkül oluşumunda rol oynarlar (Kıyan., 1999).

Wax D: Mikobakteriyel hücre duvarında bulunan bir glikolipittir. Freund's adjuvanının etkisini arttırıcı özelliğe sahiptir. Basile ait bazı proteinlerle beraber tüberküline karşı GTA oluşturur (Kıyan., 1999; Kocabaş., 1991).

Fosfatidil inositol mannosid: Hücre duvar iskeleti için bir çimento görevi görür. Sitoplazmik membrana bağlıdır. Peptidoglikan ve hücre duvar polisakkaritlerinin sentezinde rol oynarlar. Saflaştırılmış fosfatidil inositol mannosidler hapten olarak işlev görür ve antikor yanıtı oluştururlar (Saniç ve Çoban., 1999; Gedikoğlu., 1997).

M. tuberculosis bilinen histolitik enzimlere, endo veya egzo toksinlere, kapsül, fimbriya gibi klasik bakteriyel virülans faktörlerine sahip değildir. *M. tuberculosis*'de bugüne dek saptanan hiçbir yapı, antijen veya mekanizma organizmanın virülansını açıklamak için yeterli değildir (Sevinç., 2004; Kıyan., 1999).

2.2.3. Üreme Özellikleri

M. tuberculosis, zorunlu aerob bir bakteridir. Çok sınırlı oksijen ortamında çoğalmadan canlılığını sürdürebilir (Wayne and Kubica., 1986). Ortamda %5-10 CO₂ bulunması üremeyi hızlandırır (Bilgehan., 2002). Optimum üreme sıcaklığı 37°C'dir. *M. tuberculosis* dışındaki bazı türler 24-42°C arasında değişen sıcaklıklarda üreyebilirler (Gedikoğlu., 1994). Optimum pH 7,0'dir. Ancak pH 6-8 arasında da çoğalabilirler. Üremesi yavaştır, 15-20 saatte kendini eşler ve standart kültür ortamında kolonilerin oluşması en az 3 haftada gerçekleşir. 3-6-8 hafta süreyle makroskopik üreme görünür olana dek kültürlerin bekletilmeleri gerekmektedir (Kayser et al., 2002; Kıyan., 1999; Wayne and Kubica., 1986).

Mikobakteriler, enerji gereksinimlerini basit karbon kaynaklarından (glukoz, gliserol) sağlar (Kayser et al., 2002). Nitrojen kaynağı olarak asparajini ve amonyumu kullanırlar. Ayrıca aminoasit karışımları da yararlı olmaktadır (Gedikoğlu., 1994). Eser metal element yetersizliklerinin bakterinin yapı ve

metabolizması üzerinde olumsuz etkileri vardır. En önemli eser element demirdir. Mikobakterilerin magnezyum, sülfat ve fosforlar gibi mineral tuzlarına da ihtiyaçları vardır (Kıyan., 1999; Methock et al., 1999). Besiyerine %0,5 gliserol eklenmesiyle üreme desteklenebilir (Wayne and Kubica., 1986). *M. tuberculosis* pigment oluşturmaz, katı besiyerlerinde kuru, krem rengi, düzensiz R tipi (Rough) koloni yaparlar. İçinde gliserol bulunan sıvı besiyerlerinde zorunlu aerop olmasından dolayı yüzeyde zar oluşturarak ürerler (Kıyan., 1999).

2.2.4. Sınıflandırma

Bakteriyolojik özellikler ve DNA benzerlikleri açısından birbirleriyle yakından ilişkili olan türler “kompleks” başlığı altında tanımlanır ve gruplandırılırlar (*M. avium* kompleksi, *M. tuberculosis* kompleksi vb.) (Kocabaş., 2002). *M. tuberculosis* kompleksi; *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* ve *M. canettii* türlerini içerir (Metchock et al., 1999; Haas., 2000). Günümüzde tüberküloz olgularında en sık izole edilen tür *M. tuberculosis*'tir. *M. bovis* ve *M. africanum* ile meydana gelen enfeksiyon oranı %1-3'tür. *M. bovis* esas olarak sığırlarda tüberküloz etkeni olmakla birlikte geniş konak çeşitliliği gösterir. Bu türün gelişmiş olan ülkelerdeki insidansı az olup, insanlarda sıklıkla (%75-80) akciğer dışı organ tüberkülozuna neden olur. *M. africanum*, Batı Afrika'da nadiren hastalık meydana getiren bir türdür. *M. microti* ise kemirici hayvanlar için patojendir, son tür *M. canettii* ise insanlarda tüberküloz etkenidir (Roberts et al., 1991; Metchock et al., 1999; Kıyan., 1999; Frothingham et al., 1999). *M. tuberculosis* kompleks dışında kalan türler MOTT olarak isimlendirilirler. Optimal üreme süreleri ve üreme sıcaklıkları türden türe değişen bu bakterilerin çoğu zorunlu aeroptur. Fakat bazıları mikraerofilik ortamda daha iyi ürerler. MOTT hızlı ve yavaş üreyenler olarak ikiye ayrılmışlardır. Yavaş üreyenlerin uygun kültür ortamı şartlarında katı besiyerinde görülebilir koloni oluşturmak için en az 7 güne ihtiyaçları vardır. Hızlı üreyen grup ise 7 günden az bir zamanda görülebilen koloniler oluştururlar (Metchock et al., 1999).

MOTT'in enfeksiyon hastalıklarındaki rolü 1950'li yıllarda Runyon ve Timpe tarafından kanıtlanmıştır. Runyon bu bakterileri pigment oluşturma, üreme süresi ve koloni oluşturma özelliklerine göre 4 gruba ayırmıştır (Kıyan.,1999; Roberts et al.,

1991). Yavaş üreyen grup pigmentasyon özelliklerine göre; fotokromojenler (Runyon grup I), skotokromojenler (Runyon grup II), kromojen olmayanlar (Runyon grup III) ve hızlı üreyenler (Runyon grup IV) olmak üzere dört grupta toplanmıştır.

Fotokromojen mikobakterlerin kolonileri, ışıklı ortamda sarı ya da portakal sarısı renginde pigment oluştururlar. Pigment oluşturmaları için ışığa maruz kalma süreleri, türden türe farklılık gösterir. Genellikle 1 saat yeterlidir. Ancak bu süre bazı türlerde 24 saate kadar uzayabilir.

Skotokromojen mikobakteriler, hem karanlık hem de ışıklı ortamda pigment meydana getirirler. Karanlıkta sarı veya açık turuncu renkte olan koloniler, ışığa maruz kaldığında koyulaşır. Işıklı temas süresi uzarsa koloniler kızarır.

Kromojen olmayanlar, karanlık ve aydınlık ortamlarda pigment yapmazlar.

Bu sınıflandırma iyi bir taksonomik standardizasyon olmasa da, klinik yaklaşım ve identifikasyon kolaylığı sebebiyle yaygın kullanım alanı bulmuştur. MOTT türlerinin identifikasyonunda morfolojik (hücresel ve koloni görünümü), fiziksel ve biyokimyasal özelliklerden yararlanılmaktadır.

M. tuberculosis kompleks ve *M. leprae* için esas ekolojik niş (yuva), insan ve diğer sıcak kanlı hayvanlardır (Metchock et al., 1999). MOTT doğada yaygın olarak görülmektedir. Birçok MOTT'in kaynağı; su, toprak, vahşi ve evcil hayvanlardır. İnsanlara sıklıkla inhalasyon, aspirasyon ve inokülasyon yoluyla bulaşırlar. Dış ortamla temas halindeki vücut bölgelerinde kolonize olabilir veya değişik klinik tablolara yol açabilirler. Yavaş üreyen MOTT, hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalığa neden olabilirler. Hızlı üreyenler ise insanlarda nadiren enfeksiyona sebep olurlar. Tüm mikobakteriyel enfeksiyonların % 0,5-30'u MOTT'e bağlı olup, bu mikobakterilerin hastane enfeksiyonlarına da neden oldukları belirlenmiştir. (Saniç ve Çoban., 1999; Kıyan., 1999).

Klinik önemi olan tüberküloz dışı mikobakterilerin sınıflandırılması ve yaptıkları hastalıklar Tablo 2.1' de verilmiştir.

Tablo 2.1. MOTT'in sınıflandırılması ve en sık neden oldukları hastalıklar (Saniç ve Çoban., 1999).

TÜR	HASTALIKLAR
Grup I- Fotokromojenler	
<i>M. kansasii</i>	Akciğer enfeksiyonu, lenfadenit
<i>M. asiaticum</i>	Akciğer enfeksiyonu
<i>M. marinum</i>	Deri ve Yumuşak doku enfeksiyonu
<i>M. intermedium</i>	Akciğer enfeksiyonu
Grup II-Skotokromojenler	
<i>M. szulgai</i>	Akciğer enfeksiyonu, lenfadenit
<i>M. scrofulaceum</i>	Lenfadenit, Akciğer enfeksiyonu
<i>M. interjectum</i>	Lenfadenit
<i>M. gordonae, M. cooki, M. hiberniae</i>	Patojen değil
Grup III-Kromojen olmayanlar	
<i>M. avium complex</i>	Akciğer enfeksiyonu, yaygın enfeksiyon, lenfadenit
<i>M. celatum</i>	Akciğer enfeksiyonu, yaygın enfeksiyon,
<i>M. haemophilum</i>	Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda yaygın enfeksiyon
<i>M. malmoeense</i>	Akciğer enfeksiyonu
<i>M. shimoidei</i>	Akciğer enfeksiyonu
<i>M. simiae</i>	Akciğer enfeksiyonu
<i>M. ulcerans</i>	Kronik deri ülseri
<i>M. xenopi</i>	Akciğer enfeksiyonu
<i>M. gastri, M. terrae complex (M. nonchromogenicum, M. terrae, M. triviale)</i>	Patojen değil
<i>M. genavense</i>	Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda deri enfeksiyonu, septik artritis
Grup IV-Hızlı üreyenler	
<i>M. fortuitum complex (M. fortuitum subsp. fortuitum, M. fortuitum subsp. acctamidolyticum, M. fortuitum biovar 3. M. peregrinum, M. abbscessus. M. chelonae)</i>	Patojen değil
<i>M. flavescens, M. neoaurum, M. smegmatis, M. thermoresistible</i>	Patojen değil

2.2.5. Çevre Koşullarına Dayanıklılıkları

Mikobakterilerin olağanüstü hücre duvar yapıları bu bakterilere diğerlerinden ayırt edici özellikler kazandırmaktadır. Bu özellikler; asit ve alkali ortama direnç, antibiyotiklere direnç, dezenfektan, enzimler, serbest radikaller gibi toksik maddelere direnç, intrasellüler yaşam ve kronik enfeksiyon yapma, toplu kümeler halinde kuru koloniler oluşturmalarıdır (Köksal ve Yaman., 2003).

Çevre koşullarına dayanıklılıkları, epidemiyolojik ve klinik bakımdan önemlidir. Mikobakteriler kuruluğa karşı çok dirençlidirler. Ultraviyole ışınlarına, pastörizasyona, basınçlı buharla sterilizasyona duyarlıdırlar. Dezenfektanlara, diğer sporsuz bakterilere oranla daha dirençlidirler. Dezenfektanlardan; %70'lik alkole, sodyum hipoklorite, %5 fenole, povidon-iyodin'e duyarlıdırlar, ancak organik maddeler içinde olmaları dezenfektanların etkilerini azaltır. 60 ° C'de 15-20 dakikada ölürler. Doğrudan etki eden güneş ışığı ve ultraviyole ışınları mikobakterileri çabuk öldürür. Doğrudan güneş ışığı kültür bakterilerini 2 saatte, balgamdaki basilleri ancak 20-30 saatte öldürür. Malaşit yeşili gibi boyalara diğer bakterilere göre daha dirençlidir. Bu nedenle bu boyalar mikobakterilerin izole edilmesinde kullanılan besiyerlerine eklenirler (Saniç ve Çoban., 1999; Lefford., 1983).

2.3. Tüberküloz Bakterilerinin Enfeksiyonları

Tüberküloz basilleri insan vücuduna solunum, sindirim, deri ve konjunktiva gibi çok değişik yerlerden girebilmektedir. Fakat türberküloz sıklıkla solunum yolu ile bulaşır. Tüberküloz enfeksiyonu, hemen hemen tüm olgularda içinde canlı tüberküloz basili içeren ve havada asılı halde bulunan yeterince küçük damlacıkların (1-5 µm) solunum yoluyla alınması ile gerçekleşir. Kaynak, genellikle balgam yaymaları ARB pozitif olan akciğer ve larenks tüberkülozlu hastalardır (Dunlap et al., 2000). Bu hastaların öksürük, hapsirik ve konuşmaları sırasında havada asılı halde kalabilen damlacık çekirdekleri oluşur. Bir öksürük yaklaşık 3000 enfeksiyöz damlacık içermekte olup, yayma pozitif bir hastanın balgamında ml' de en az 5000-10000 basil bulunmaktadır. Bulaşma, enfeksiyöz damlacığın havada asılı kalabileceği kapalı mekanlarda olur (Lee et al., 1998; Hopewell and Bloom., 2000).

Yetişkinler için en önemli risk faktörleri, havadaki enfeksiyöz damlacığın konsantrasyonu ve bu havayı soluma süresinin uzunluğudur (Harries and Maher., 1996). Ayrıca hasta kişinin tüberküloz tedavisi altında olmaması da bulaştırmacılık oranını etkilemektedir. Tedavi gören hastalarda basil sayısı logaritmik olarak azalmakta ve 1-2 haftalık tedavi ile bulaştırmacılık riski sifıra dek azalmaktadır (Leitch., 2000).

Bulaşma sonrası enfeksiyon oluşup oluşmaması veya hastalık meydana gelip gelmemesi konağın direnci ile bakteriyel virülans arasındaki dengeye bağlıdır (Kıyan., 1999).

M. tuberculosis, zorunlu aerob bir bakteri olduğundan oksijenin bol olduğu organ ve dokulara yerleşerek hastalık oluşturabilir. Tüberküloz en çok akciğerlerde, sonra da plevra, meninks, periton gibi seröz zarlarda, böbrek, eklem, kemikler, lenf bezleri, larenks, genital sistem, bağırsaklar ve diğer organlarda da görülebilir (Kıyan., 1999).

2.3.1. Primer Tüberküloz

Primer enfeksiyon, tüberküloz basili ile hiç karşılaşmamış veya BCG ile aşılanmamış, tüberkülin deri testi negatif olan kişilerde, bireyin ilk defa enfekte olmasıdır. Solunum yoluyla alınan basiller 2. ve 3. haftada akciğerde veya lenfo-hematojen yayılım odaklarında sürekli çoğalırlar ve granülomlar oluşur. Bağışıklık yanıtının güçlü olduğu kişilerde lezyonlar iyileşir ve kalsifiye olur. Birkaç basil gizli (dormant basil) kalabilir. Bu dönemde klinik ve radyolojik bulgu yoktur. Tüberkülin deri testinin pozitifleştiği bu sürece “primer enfeksiyon” denir (Kılıçaslan., 2002; Kocabaş., 2002). Bağışıklık yanıtı basilin çoğalmasını durduracak kadar güçlü değilse birkaç ay içinde hastalık ilerler ve primer tüberküloz gelişir (Harries and Maher., 1996). Konağın savunma mekanizmasını yenen ve hayatta kalan basiller, akciğer parankiminde çoğalmaya başlar. Akciğerin periferinde, orta ve alt zonlarında yerleşen lezyona primer odak veya ghon odağı denir. Ghon odağı ve ilişkili aynı tarafta büyümüş hiler lenf bezi ile birlikte “primer kompleks” veya “Ghon kompleksi” olarak adlandırılır. Bu kompleks vücudun herhangi bir yerinde gelişebilir fakat en çok akciğerlerde görülür.

Hastalarda öksürük, ateş, iştahsızlık, gece terlemesi gibi yakınmalar görülebilir. Radyolojik incelemelerde bulgular saptanır. Primer tüberkülozda; primer kompleksin akciğer ve lenf bezi unsurları bazı komplikasyonların gelişimine neden olabilir (Kocabaş., 2002)

Tüberkülozun yaygın olduğu ülkelerde, tüberküloz basili ile karşılaşma ve tüberküloz daha çok çocukluk döneminde görüldüğü için bu ülkelerde ve ülkemizde primer tüberküloz deyimi çocukluk tüberkülozu olarak da adlandırılmıştır (Kocabaş., 2002). Bir yaş altındaki çocukların %45-50'sinde, bir yaş üstündekilerin ise %85-95'inde tesadüfen çekilen akciğer grafileri ile tanı konur. Bir çocukta; balgam yayması pozitif olan aktif tüberkülozlu bir hasta ile temas hikayesi, PPD pozitifliği ve akciğer grafisindeki bulgular primer tüberkülozu düşündürmelidir (Kıyan., 1999).

Miliyer Tüberküloz: Primer kompleksten, kanla tüm vucuda yayılan basiller akciğerlerde ve diğer organlarda yerleşerek sayısız küçük tüberküloz odakları oluşturur. Daha çok 0-4 yaş arası çocuklarda primer enfeksiyonun erken komplikasyonu olarak ortaya çıkar. Miliyer tüberkülozu birkaç hafta içinde ortaya çıkabilen, tüberküloz menenjit izleyebilir (Umut ve Yıldırım., 2001; Kıyan., 1999). Erişkinlerde kişinin direncinin az olduğu koşullarda, eski bir tüberküloz lezyonunun aktive olup, kana geçmesiyle de miliyer tüberküloz ortaya çıkabilir. Miliyer tüberkülozlu hastaların %30'unda PPD negatiftir (Kılıçaslan., 2002). Çeşitli vücut sıvılarından *M. tuberculosis*'i izole etmek mümkündür. Kemik iliği, karaciğer, lenf bezi, akciğer gibi doku biyopsi örneklerinde, basilin gösterilmesi ve üretilmesi histopatolojik bulguların saptanması tanıda önemlidir (Aygen ve Doğanay., 1996).

2.3.2. Sekonder Tüberküloz (Yetişkin Tüberkülozu)

Hastalığı sağlam kişilere bulaştırmaktan sorumlu olduğu için, halk sağlığı açısından büyük önem taşıyan, tüberkülozun en yaygın ve önemli klinik şeklidir (Kocabaş., 2002). Primer enfeksiyon geçiren ve tüberkülin deri testi pozitifleşen kişilerde aylar veya yıllarca süren latent bir sürecin ardından gelişen sekonder tüberküloz, primer lezyonun endojen reaktivasyonu veya egzogen reenfeksiyon şeklinde oluşur. Gelişmiş ülkelerde orta ve ileri yaş grubunda daha sık ortaya

çıkarken, gelişmekte olan ülkelerde daha çok genç yaşlarda görülmektedir (Leitch., 2000).

Endojen Reaktivasyon: Primer enfeksiyondan sonra aylar veya yıllarca dokularda canlılığını sürdüren basillerin (dorman basil) hayatın herhangi bir döneminde hücresel bağışıklık yanıtta meydana gelen baskı nedeniyle (stres, beslenme yetersizliği, kemoterapi, AIDS vb.) aktif hale geçip, çoğalmasıyla meydana gelir. Böylece akciğer dışı organ tüberkülozuna ve akciğer apeksinde kaviter akciğer tüberkülozu gelişimine neden olur. Endojen reaktivasyon primer komplekste (orta-alt akciğer zonlarındaki ilk akciğer odağında ve komşu lenf bezinde) değil, akciğer apekslerindeki hematojen yayılım odaklarında gelişmektedir.

Egzojen reenfeksiyon: Daha önce primer enfeksiyon geçirmiş, PPD pozitif olan kişiler, eğer tüberküloz basili ile yeniden karşılaşılırsa, mevcut hücresel bağışıklık sistemi bu basillerin alveollere yerleşmesini ve çoğalmasını önler. Fakat bu koruma tam değildir. Tüberküloz basilleri ile karşılaşma yoğunsa ve sık tekrarlanıyorsa, basiller hava yolu ile geldikleri akciğer apekslerine yerleşebilirler. Basiller burada çoğalıp, belli bir sayıya ulaşıncı immün T lenfositler lezyon bölgesine gelerek kazeifikasyon nekrozu oluştururlar. Böylece basillerin büyük bir kısmı yok edilir, az sayıda basil dorman hale geçer ve bu şekilde canlılıklarını sürdürürler. Eğer hücresel bağışıklık zayıflarsa, bu basiller tekrar çoğalmaya başlarlar (Kocabaş., 2002; Saniç ve Çoban., 1999).

2.3.3. Ekstrapulmoner (Akciğer Dışı) Tüberküloz

Akciğer dışı tüberkülozun klinik formlarına ekstrapulmoner tüberküloz denir. Tüm tüberküloz olgularının %80'ini akciğer, %20'sini de akciğer dışı tüberküloz oluşturmaktadır. (Rieder et al., 1999).

Akciğer dışı organ tüberkülozu tanısı akciğer tüberkülozuna göre daha zordur. Enfeksiyon yavaş ilerleyebilir veya yayılma sonucu akut olarak da ortaya çıkabilir. Vakaların hepsinde kesin tanıya, biyopsi örneklerinde ve uygun kültürde mikobakterilerin gösterilmesiyle varılmalıdır. Ayrıca HIV (Human Immunodeficiency Virüs) enfeksiyonlu hastaların, akciğer dışındaki organlarda

tüberküloza yatkın olması nedeniyle ve hastalardaki bulgular diğer kişilerden farklı olduğundan önemlidir. Yapılan çalışmalara göre, dünyada HIV enfeksiyonundaki artışla orantılı olarak akciğer dışı tüberküloz olgularında da artış görülmüştür (Iseman., 2002; Dunlap et al., 2000).

Plevra Tüberkülozu: Genç erişkinlerde geçirilmiş tüberküloz enfeksiyonunun şekli olarak ortaya çıkar. Radyolojik olarak belirtisi olmayan, plevranın altında yerleşimli tüberküloz odaklarının plevral aralığa açılmasıyla oluşur. Genellikle plevral sıvı toplanmasıyla kendini gösterir. Primer enfeksiyondan 3-6 ay sonra ortaya çıkar. Olgularda doğrudan boyamada basilin gösterilme oranı düşük olup, yarısından çoğunda kültür pozitifliği vardır. Biyopsi örneklerinde doğrudan basili gösterme oranı da yüksektir (Niksarlıoğlu Özgün ve Çöplü., 2003; Aygen., 2002; Dunlap et al., 2000).

Perikard Tüberkülozu: Çoğunlukla *M. tuberculosis* ile enfekte mediastinal veya hiler lenf bezinin perikard aralığına açılması sonucu gelişir. Seyrek olarak plevra tüberkülozu da perikarda yayılabilir (Kılıçaslan., 2002; Aygen., 2002; Crofton et al., 2002). Perikard tüberkülozunda eksüda niteliğinde sıvı oluşur. Doğrudan mikroskopla incelemede basil pozitifliği düşük oranda olup, kültürde izolasyon oranı ise %50'dir. Tanıda perikardiyal biyopsi örneğinin histopatolojik ve mikrobiyolojik olarak incelenmesi de önemlidir (Crofton et al., 2002; Aygen., 2002).

Kemik ve Eklem Tüberkülozu: *M. tuberculosis*'in, primer enfeksiyonu sırasında akciğerden hematogen yol ile veya nadiren yakın bir kazeöz lenf nodundan lenfatik yolla kemiklere veya eklemlere ulaşmasıyla ortaya çıkar. Enfeksiyon herhangi bir kemikte veya eklemde ortaya çıkabilir. Bütün kemik veya eklem tüberkülozu olguları, ilk enfeksiyonu izleyen 3 yıl içerisinde gelişir. Fakat hastalık primer enfeksiyondan çok uzun süre sonra da ortaya çıkabilir. Apse, sinoviyal sıvı, sinoviyal biyopsi, kemik biyopsisi örneklerinde ARB bakılması ve kültür ile tanı konur. PPD testi genellikle pozitifdir.

Omurga tüberkülozuna tüberküloz spondilit veya Pott hastalığı adı verilir. Periferik osteoartiküler tüberkülozda genellikle kalça ve diz eklemi gibi ağır yük taşıyan eklemler tutulmakla beraber, diğer eklemler de tutulabilir. Tüberküloz

osteomyeliti, her kemikte görülebilir. En sık tutulanlar; kostalar, kafatası, parmaklar, pelvis kemikleri ve uzun kemiklerdir (Kılıçaslan., 2002; Yüce., 2004; Dunlap et al., 2000).

Genito-üriner Sistem Tüberkülozu: Bu grup içinde böbreklerin, üreterlerin ve mesanenin ürolojik hastalıkları, kadınların diğer genital yapıları, fallop tüpleri, endometrium ve overleri, erkeklerde prostat, epididim, ve testisler yer alır. Genitoüriner tüberküloz yaşlılarda belirgin olarak daha sık görülmektedir (Iseman., 2002). Genitoüriner tüberkülozlu olguların %52-76'sında aktif veya geçirilmiş tüberküloz bulunur. Kesin tanı; idrar, akıntı, semen gibi örneklerin kültürlerinde basilin gösterilmesi veya biyopsi örneğinin patolojik incelenmesi ile konulur (Aslan., 2004).

Böbrek Tüberkülozu: Primer enfeksiyon bölgesinden basillerin kanla yayılması sonucu oluşur. İlk enfeksiyondan 5-15 yıl sonra hastalık geç olarak gelişir. Hastalık böbreğin dış kısmında (kortekste) başlar, yayıldıkça böbrek dokusu harabiyetine sebep olur (Crofton et al., 2002). Böbrek tüberkülozu alt üriner yapıları (üreter ve mesaneyi) tutmak üzere yayılabilir. Erkeklerde görülme oranı 1,5 kat daha fazladır.

İdrarda basil sayısının azlığı ve saprofit mikobakterilerin yanlış pozitiflik vermesi nedeniyle doğrudan mikroskopik inceleme tanıda yardımcı değildir. Üç sabah üst üste alınan idrarda *M. tuberculosis* için kültür pozitifliği %80-90'dır. İdrar kültürü negatif olan olgularda, alınan böbrek biyopsi örneğinin sitolojik olarak incelenmesi ve kültür tetkiki yapılması ile tanı konulabilmektedir (Aygen., 2002).

Erkek Genital Sistem Tüberkülozu: Tüberküloz basilinin lenfohematojen yolla yayılması veya böbrekteki enfekte odakta doğrudan yayılımı sonucu gelişir. Prostat, vesikula seminalis, epididim ve testisler tutulabilir. Muhtemel genital tüberkülozu olan erkeklerde, histolojik ve kültür çalışmaları için kitle lezyonlardan biyopsi alınarak, şüpheli olgular tüberküloz yönünden araştırılmalıdır (Aygen., 2002; Iseman., 2002).

Kadın Genital Sistem Tüberkülozu: Hematojen yolla oluşan endosalpinksteki bir tüberküloz odağının diğer genital organlara yayılımı ile oluşur,

%90'ı üreme çağında görülür. Fallop tüpleri %85, endometriyum %75 ve overler %35 oranında tutulurlar. Vajen ve vulvanın tutulumu nadirdir (Aslan., 2004; Umut ve Yıldırım., 2001; Aygen., 2002). Tanıda, serviksten ve endometriyumdan yapılan biyopsilerin, servikal yayma ve menstrüasyon kanının histopatolojik ve mikrobiyolojik incelenmesi gereklidir (Dunlap et al., 2000; Lee et al., 1998).

Gastrointestinal Sistem Tüberkülozu: Yaygın kaviter akciğer tüberkülozlu ve larinks tüberkülozlu hastalarda, enfekte balgamin yutulması veya kanla basillerin yayılımı ile oluşur. Basil, gastrointestinal kanalın her bölgesine yerleşebilir. En sık ileum ve ileoçekal bölgeyi tutmaktadır. Kolon, apendiks, jejunum, rektum, duodenum, mide, özafagus ve farinkse de yerleşebilir. Ağızda tüberküloz nadir olup, genelde diş etinde ağrı yapmayan lezyonlar şeklindedir (Haas and Prez., 1995; Aygen ve Doğanay., 1996). Karaciğerde, hepatik tüberküloz görülebilmektedir. Tüberküloz olgularının %1'i hepatik tüberkülozludur. Dalak tutulumu nadirdir (Bilir ve ark., 2000).

Tanı için radyolojik inceleme yapılmalı, ağız, farinks ve anal bölgedeki lezyonların biyopsi örneklerinin ve endoskopi incelemesi ile alınan biyopsi örneğinin, histopatolojik ve mikrobiyolojik analizinin yapılması gereklidir (Aygen., 2002; Haas and Prez., 1995).

Periton Tüberkülozu: Hastalık çoğunlukla peritondaki latent tüberküloz odağının reaktivasyonu ile ortaya çıkar veya aktif pulmoner veya miliyer tüberkülozun kanla yayılımıyla veya komşu organlardan doğrudan yayılımı ile gerçekleşir (Bektaş., 2003). Periton sıvısında basil pozitifliği nadir olup, kültürden %25 oranında basil izole edilebilmektedir. Periton sıvısında adenoazin deaminaz aktivitesinin ve interferon gamma (IFN γ) düzeyinin artması tanıda önemlidir. Tanı konamayan olgularda biyopsi yapılmalıdır (Aygen., 2002; Haas and Prez., 1995).

Lenf Bezi Tüberkülozu: En sık görülen akciğer dışı tüberküloz şekillerinden biridir. Primer enfeksiyon sırasında lenfatik yayılımla ve kan yolu ile *M. tuberculosis*'in lenf bezlerini tutmasıyla oluşur (Umut ve Yıldırım., 2001). Genç erişkinlerde sık görülür. Tanıda, tutulan lenf bezinden alınan biyopsi örneğinin

mikrobiyolojik ve potolojik incelemelerinin yapılması gerekir. Tanı, mutlak olarak sadece mikrobun kültürde taminlanması ile konur (Aygen., 2002; Iseman., 2002).

Deri Tüberkülozları: Deri tüberkülozlarının tüm deri hastalıkları arasında görülme sıklığı %0,3'tür. Fakat son yıllarda HIV enfeksiyonunun yaygınlaşması ile birlikte deri tüberkülozu sıklığında artış saptanmıştır.

Sekonder deri tüberkülozlarından Lupus vulgaris, vücuttaki tüberküloz odağından basilin kanla veya lenfle deriye geçmesiyle oluşur. Deri tüberkülozunun en sık görülen şeklidir (Aydın., 2003).

Basilin deriye girişi genellikle açık deri alanlarından özellikle yüz ve ekstremitelerde görülür. Sıyrık, çizik, yaralanmalar, böcek ısırıkları basil için giriş kapısı oluşturabilir. Ayrıca sünnet, yeterli sterilizasyon yapılmamış enjeksiyonlar, kulak delme vb. uygulamalarla da basil deriye girebilir. İlk görülen lezyon küçük bir papüldür. Sonrasında ağrısız ülser (tüberküloz şankrı) gelişir. Tanıda basilin gösterilmesi ve üretilmesi esastır (Kundakçı ve Taşpınar., 1996).

Merkezi Sinir Sistemi Tüberkülozu: Primer tüberkülozun bir komplikasyonu olarak gelişir, ileri yaşlarda ise primer tüberkülozun kanla yayılımı ile merkezi sinir sistemine yerleşen basillerin aktivasyonu ile veya miliyer tüberkülozlu hastalarda kanla yayılmasıyla gelişir. Sakatlık riski en yüksek olan tüberküloz şeklidir.

Tüberküloz menenjit, tüberkülozun en ağır şeklidir. Kesin tanı, BOS (beyin omurilik sıvısı)'da tüberküloz basilinin gösterilmesi ve üretilmesi ile konur. Doğrudan muayenede basilin bulunması zor olup, kültürde üremesi zaman aldığından PCR (polimeraz zincir reaksiyonu), BOS'da basil saptaması için duyarlı bir yöntemdir (Umut ve Yıldırım., 2001).

Tüberküloz menenjitinin erken tanısında BOS'da adenoazin deaminaz aktivitesinin yükselmesinin gösterilmesi, lateks aglutinasyonu veya ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ile mikobakteriyel antijenlerin gösterilmesi de önemlidir (Kundakçı ve Taşpınar., 1996; Haas and Prez., 1995).

Kafa içi tüberkülozunda santral sinir sistemine yerleşmiş tüberkülomların yarattığı klinik bulgular tümöre benzer. Olguların % 25'inde başka organda tüberküloz bulunmaktadır. Genellikle BOS normal olup, kesin tanı biyopsi ile konur (Dunlap et al., 2000).

Diğer Organ Tüberkülozları: Tüberküloz; larinks, tonsil, yumuşak damak, dil, orta kulak, göz, meme, adrenal bez gibi organlarda da görülebilmektedir (Aygen., 2002).

2.4. Tanı Yöntemleri

Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında önemlidir. Tüberküloz tanısında, klinik belirtiler ve bulgular, radyolojik değerlendirmeye, tüberkülin deri testi sonucunun değerlendirilmesi önemlidir. Fakat tüberkülozun tanısında altın standart, *M. tuberculosis* basilini klinik örneklerde bulmak ve kültürde üretmektir. Son yıllarda tüberküloz tanısında moleküler ve serolojik yöntemler geliştirilmekte ve kullanılmaktadır. Doku biyopsi örneklerinin incelenmesi tüberküloz tanısında kullanılan diğer bir yöntem olup, tüberküloz tanısı için anlamlıdır. Tanıda, mikroskopik incelemeler sonucunda hastalar “yayma pozitif” ya da “yayma negatif” olarak ayrılır ve tedaviye başlanılır. Tüberkülozun hasta kişiden sağlam kişiye solunum yolu ile bulaşıp, tek bir basilin bile akciğere girmesiyle enfeksiyon oluşturabileceği göz önüne alındığında, hastalara mümkün olduğu kadar hızlı tanı konması ve tedaviye başlanması son derece önemlidir (Iseman., 2002; Catanzaro et al., 1997).

Mikobakteriyoloji laboratuvarlarında hem laboratuvar çalışanlarını, hem de diğer personeli korumak amacıyla, laboratuvarın tasarım, düzenleme ve ekipmanına özen gösterilerek, laboratuvarlarda önlemlerin alınması zorunludur (WHO/TB/98.258., 1998). Kültür ve ilaç duyarlılığı yapılan laboratuvarlarda, aerosollerin kontrolü ve diğer mikobakteriyel kontaminantlardan korunmak için Sınıf II biyolojik emniyet kabinleri kullanılmalıdır, çalışmalar negatif hava çekimi altında yapılmalıdır. Yüksek hızlı santrifüjler kullanılarak aerosolleşme önlenmelidir. Çalışma alanları yeterli miktarda ısıma ve dezenfeksiyon sağlayan, ultraviyole

lambaları ile desteklenmelidir. Kişisel korunma ekipmanları (0,5-1 µm büyüklüğündeki partiküller için %90'dan fazla koruyucu özellikte maskeler, önlük, eldiven, kep vb.) kullanılmalıdır (Metchock et al., 1999; Richmond and McKinney., 1999).

Mikobakteriyoloji laboratuvarlarının, tüberkülozun tanı ve tedavisindeki rolleri, mikobakterilerin klinik örneklerde saptanarak izole edilmesi, mikobakteri türlerinin saptanması ve üretilen basilin tüberküloz ilaçlarına karşı duyarlılığının saptanmasıdır. Bunun için, örneğin uygun şekilde alınarak laboratuvara taşınması, gönderilen örneğin işlenmesi (dekontaminasyon ve yoğunlaştırılması), yoğunlaştırılan örnekten yayma yapılarak mikroskopik inceleme yapılması, kültür yapılarak basilin izole edilmesi, üretilen basilin türünün saptanması ve son olarak duyarlılık testlerinin yapılması gerekmektedir (Kocabaş., 2002)

2.4.1. Klinik Örneklerin Alınma ve Laboratuvara Gönderilme Koşulları

Tanıda kullanılacak klinik örnekler antimikrobiyal tedaviye başlanmadan önce alınmalıdır (Metchock et al., 1999). Akciğer ve akciğer dışı tüberküloz tanısı için alınacak klinik örnekler, steril veya kontamine bölgelerden alınabilir. Kontaminasyonu en aza indirmek için örnekler olabildiğince aseptik koşullarda ve yeterli miktarda alınmalıdır. Klinik örnekler temiz, steril, tek kullanımlık, sızdırmaz, dayanıklı kaplara alınmalıdır. Kap içine mikobakterilerin canlılığını etkileyebilecek kimyasal madde ve dezenfektan konulmamalıdır. Örnek kabının üzerine hasta adı, örnek tipi ve alındığı tarih yazılmalıdır (Metchock et al., 1999; Dunlap et al., 2000; Öztürk., 2003). Klinik örnekler en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Aksi taktirde örneğin özelliğine bağlı olarak 2-8 °C' de bir geceyi aşmayacak şekilde saklanmalıdır (Metchock et al., 1999). Sürüntü örnekleri kısıtlı örnek sağladıkları ve mikobakterilere hidrofobik özellik sağladıkları için silgeçten besiyerine aktarılmaları güçtür. Başka bir şekilde hastadan örnek alınamıyorsa taşıyıcı besiyerine konularak kabul edilebilir. Uygun kapta gelmeyen, 24 saat biriktirilmiş, dondurulmuş örnekler çalışmaya alınmamalıdır (Öztürk., 2003).

Balgam ve Diğer Solunum Yolu Sekresyonları: Tüberküloz tanısı için gelen solunum yolu örnekleri; balgam, uyarılmış balgam, açlık mide sıvısı, BAL (bronkoalveolar lavaj), transtrakeal aspirasyon, bronşiyal fırçalama ve laringeal sürüntü örnekleridir.

Balgam; akciğer tüberkülozunun teşhisinde en önemli klinik örneklerden birisidir. Bronşların ve trakeanın ürünü olup, boğaz florasındaki mikobakteri dışındaki bakterileri de içerdiğinden kontamine bir örnektir (Özkara ve ark., 2003; Bannister et al., 1996). Hastadan birbirini izleyen 3 gün, 5-10 ml tükürük içermeyen balgam; steril, kırılmaz, şeffaf olmayan bir kap içine, hasta ilaç almadan veya yemek yemeden önce, ağzını suyla çalkaladıktan sonra alınır. Tercihen sabah çıkarılan ilk balgam alınmalıdır. Tedavi gören hastalarda, tedaviye başladıktan 3 hafta sonra birer haftalık aralarla balgam örnekleri alınmalıdır (Metchock et al., 1999). Balgam, özel korunaklı bir odada veya açık havada çıkartılmalıdır. Kontaminasyon oranı fazla olacağından 24 saatlik biriktirilmiş balgam örneği ve tükürük kabul edilmemelidir (Koneman et al., 1997). Balgam çıkaramayan hastalardan, uyarılmış balgam örneği alınabilir. Uyarılmış balgam örneğinin alınmasında; steril, ılık, aerosolize hipertonic tuzlu su (%3-15 NaCl) hastaya nebulizatör yardımı ile solutulur ve kuvvetli bir öksürük ile hastanın sulu balgamı alınır. İncelenecek balgam örneği en az 10 ml olmalıdır (Dunlap et al., 2000; Baron et al., 1994).

Eğer balgam alınamıyorsa bronkoskopi yapılması da uygun görülmektedir. BAL, bronşiyal yıkama örnekleri, transbronşiyal aspiratlar ve bronşiyal fırçalamalar tanı koyma şansını arttırmaktadır. BAL, en az 5 ml olacak şekilde steril kaplara alınır. Bronkoskobide, kullanılan bronkoskobun fiziksel temizliği ve kimyasal sterilizasyonuna dikkat edilmeli ve musluk suyu ile kontaminasyonu elgellenmelidir (Metchock et al., 1999; Dunlap et al., 2000).

Açlık Mide Sıvısı: Bebekler, çocuklar ve koma halindeki balgam çıkaramayan hastalardan, başka yöntemlerle örnek alınamıyorsa açlık mide sıvısı alınabilir. En az 5-10 ml örnek, birbirini takip eden 3 gün boyunca stereril kap veya şişelere alınmalıdır. Hastanın uykuda iken yuttuğu balgamı alabilmek için, sabah hasta açken mide lavajı yapılmalıdır. Örnek alınır alınmaz veya en geç 4 saat içinde mide sıvısına 100 mg sodyum korbonat eklenerek nötral pH'a ayarlanmalıdır. Nötralize edilmemiş

örneklerde asit pH mikobakterilere zarar vereceğinden işleme tabi tutulmamalıdır. Açlık mide sıvısı, midede besinlerle alınan saprofit mikobakterileri de içerebileceğinden, bu örneklerden yapılan yaymalar yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir (Metchock et al., 1999). Bu nedenle uyarılmış balgam, açlık mide sıvısına tercih edilebilmektedir. Ancak uyarılmış balgam alımını takiben yarım saat içinde alınan açlık mide sıvısının beraber değerlendirilmesinin daha doğru sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Öztürk., 2003).

Larenks Sürüntüsü: Diğer yöntemlerle örnek alınma şansı olmayan çocuklarda ve balgam çıkaramayan ve yutan hastalarda larenks sürüntüsü alınır. Steril kap içinde yaklaşık 1 ml serum fizyolojik çözeltisi içinde laboratuvara gönderilir.

Ekstrapulmoner (Akciğer dışı) Örnekler:

İdrar: Gece boyu mesanede biriken en az 40 ml idrar tercih edilir. Dış ürogenital bölge temizlendikten sonra, sabah alınan orta akım idrarı hemen laboratuvara ulaştırılmalıdır. 24 saatlik biriktirilmiş idrarlar, kontaminasyon riskini arttırdığı için çalışılmamalıdır (Metchock et al., 1999; Baron et al., 1994; Öztürk., 2003).

Steril Vücut Sıvıları (BOS, Plevra, Perikard, Periton Sıvıları): Klinik örnekler aseptik koşullarda aspirasyonla veya cerrahi yöntemlerle alınır. Örnekler az sayıda mikobakteri içerdiği için mümkün olduğunca fazla miktarda alınarak, mikobakterilerin kültürde üretilme şansı artırılır (Metchock et al., 1999). Örneklerden pıhtılaşma özelliği olanlara steril %20'lik sodyum sitrat veya oksalat eriyiğinden birkaç damla damlatılır veya toplama kabına antikoagülan olarak sodyum polianetol sülfonat veya heparin eklenebilir. Alınacak örnekler en az 10-15 ml olmalıdır. Steril klinik örnekler, santrifüj edilerek çökeltiden preparat hazırlanır ve kültüre ekilir (Öztürk., 2003; Özkara ve ark., 2003; Bilgehan., 2002).

BOS: Aseptik şartlarda, en az 2 ml olacak şekilde alınmalıdır. Genelde basil miktarı az olduğundan, santrifüjlenerek çökeltiden ekim yapılır, daha sonra yayma yapılır. Bazen oda sıcaklığında 1 gün bekletilen BOS'da fibrin ağı oluşur. Basillerin

fibrin ağında görülme olasılığı daha fazladır (Kıyan., 1999; Baron et al., 1994; Öztürk., 2003).

Dokular (Lenf Nodu, Deri, Diğer Biyopsi Örnekleri): Aseptik şartlarda en az 1 g doku parçası, fiksatif veya koruyucu içermeyen steril kaplara alınarak laboratuvara gönderilmelidir. Alınan örnek tuzlu suya veya başka bir sıvıya konulmamalı, gazlı beze sarılmamalı ve formalin içinde gönderilen örnekler çalışılmamalıdır. Dokular özel olarak ezildikten sonra işleme alınmalıdır. Kontamine bölgelerden alınan örneklerle dekontaminasyon işlemi uygulanmalıdır. (Özkara ve ark., 2003; Dunlap et al., 2000; Metchock et al., 1999; Öztürk., 2003).

Abse Örnekleri, Aspirasyon Sıvıları, Deri Lezyonu ve Yaralar: Cilt temizliği yapılarak örnek alınmalıdır. Mümkün olduğunca çok miktarda örnek, enjektörle aspire edilmelidir. Sürüntü örnekleri alındığında, taşıyıcı besiyerine konularak laboratuvara gönderilmeli ve kurumuş sürüntü örnekleri çalışılmamalıdır (Öztürk., 2003).

Kan: Özellikle AIDS’li bağışıklık sistemi baskılanmış olgularda, mikobakterilerin izole edilmesi amacıyla, kültür için kan alınmalıdır. Genellikle yaygın mikobakteri enfeksiyonları Mycobacterium avium kompleks (MAC)’e bağlıdır. Kan örneği alınmadan önce, kanın alınacağı bölge dezenfekte edilmelidir. Mikobakteriyel kan kültürleri için radyometrik BACTEC 13 A kan kültür şişeleri (Becton-Dickinson) veya “isolator lysis centrifugation system (Wompole lab.) kullanımından iyi sonuç alınmaktadır. Alınan kan örneği doğrudan hasta başında 10 ml “isolator” tüpüne veya Bactec 13 A şişesine 5 ml konulabilir. “Isolator” tüpler, hücreleri eritip, intrasellüler mikobakterinin salınımını sağlayan saponin ihtiva ederler. Bactec 13 A şişeleri de antikoagülan madde olarak sodyum polianetol sülfonat veya heparin içerirler. Eğer bu işlem yapılamayacaksa 10 ml kan, sodyum polianetol sülfonat veya heparin içeren steril tüplere alınır ve karıştırılır ve laboratuvara gönderilir. EDTA (etilendiamin tetra asetik asit)’li veya koagüle olmuş kan ekim için kullanılmamalıdır (Baron et al., 1994; Metchock et al., 1999). Ortalama 23-25 gün içinde mikobakteriler kandan izole edilebilmektedir (MAC için 22-65, *M. tuberculosis* için 33-35 gün) (Esteban et al., 1998).

Dışkı: AIDS’li olgularda bağırsaklarda bulunan mikobakteri sayısının yüksek olması nedeniyle dışkı örneği, doğrudan inceleme ve kültür amacıyla kullanılabilir (Saniç ve Çoban., 1999). En az 1 g dışkı örneği, steril tek kullanımlık kaplara alınarak, en az 2 saat içinde laboratuvara gönderilir. Aside dirençli bakteri bulmak için dışkı kültürünün klinik faydası tartışmalıdır. Zira, dışkıda saprofit mikobakteriler her zaman bulunabilir. Bu nedenle yaymada çok miktarda aside dirençli basil görüldüğünde kültür yapılmalıdır (Kıyan., 1999; Metchock et al., 1999).

2.4.2. Mikroskopik İnceleme

2.4.2.1. Mikroskopik İnceleme İçin Yayma Yapılması

Makroskopik inceleme ile klinik örneklerin irinli ve kanlı kısımları tespit edilerek, bu bölgelerden yaymalar hazırlanmalıdır (Kıyan., 1999).

Kırılma, boyamada başarısızlık veya az sayıda basil içeren pozitiflikleri doğrulamak için her örnekten birkaç yayma yapılması önerilmektedir. Hiç kullanılmamış, üzerinde çizikler olmayan lam alınır ve üzeri hasta bilgisi ile etiketlenir. Kenarı aşındırılmış (rodajlı) lam kullanılırsa, kurşun kalemle de hasta numarası yazılabilir. Lamlar kullanılmadan önce etanole daldırılarak temizlenebilir.

Konsantre örneklerde (idrar, plevra sıvısı, BOS), steril vücut doku ve sıvılarından hazırlanan preparatlarda, tek bir basilin bile görülmesi anlamlıdır. Bu nedenle örneklerde bakteri sayısı fazla olmadığından 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek, sedimentten öze ile veya steril pipetle yayma yapılır. Konsantre olmayan örneklerde; iltihaplı, kanlı veya nekrotik bölgeden örnek alınır. Balgam örneklerinde öze ile iltihaplı kısımları alınmaya çalışılır.

Örnekler, lam üzerine dairesel olarak yayılır. Lam üzerine birden fazla yayma yapılmaz. Balgam örneklerinin yayması yapılırken ne çok ince, ne de çok kalın olmalıdır. Yayma sırasında, öze ile fazla bastırılmamalı ve enfekte örneğin çevreye sıçramasına engel olunmalıdır. Sonrasında öze iyice alevden geçirilir, pipetler dezenfektan içeren kaba atılır. Her örnek için yeni bir pipet kullanılır.

Yayma, biyolojik güvenlik kabinlerinde havada kurutulur ve lama tespit edilir. Elektrikli lam ısıtıcısında (65-70°C) en az 2 saat tespit edilir veya bek'in mavi alevinden fazla ısıtılmadan, çok hızlı veya yavaş olmayacak şekilde 3 veya 4 kez alevden geçirilir. Lamlar saf metanol ile kaplanıp, 1 dakika bekletilerek de tespit edilebilir. Lamlar ısı ile tespit edilirken tüm mikobakteriler ölmeyebilir. Bu nedenle lamlar, dikkatli tutulmalı ve inceleme bittikten sonra biyolojik tehlike işareti taşıyan atık çöpüne atılmalıdır.

BOS'dan yayma yapılırken, BOS sedimenti vortekslendikten sonra, lamin ortasına steril pastör pipeti veya öze ile bir damla yerleştirilir. Damla havada kuruduktan sonra işlem 2 kez daha yapılır. Her defasında yeni damla doğrudan önceki damlanın üzerine damlatılmalıdır. Havada kurutulduktan sonra lamlar tespit edilir (Özkara ve ark., 2003; Sarıgüzel., 2003).

2.4.2.2. Aside Dirençli Boyama Yöntemleri

Aside dirençli boyama; lipitten zengin olan hidrofobik karakterdeki mikobakteri hücre duvarının, primer boya ile boyanıp, renk giderici asit-alkolle muamelesinden sonra, boyayı vermemesi esasına dayanır (Sarıgüzel., 2003).

Tüberküloz tanısında ilk basamak klinik örneklerden hazırlanan yaymaların, aside dirençli boyama tekniği kullanılarak boyanıp, mikroskopta incelenmesidir (Dunlap et al., 2000). Mikroskopta incelemenin iki önemli sınırlaması vardır. Bunlar, duyarlılığın nispeten az olması ve özgül olmayışıdır. Doğrudan mikroskopik incelemede aside dirençli basillerin görülebilmesi için, örneğin mililitresinde en az $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ basil olması gerekirken, kültürde pozitiflik yakalamak için örneğin mililitresinde en az 10-100 basil olmalıdır. Bu nedenle doğrudan inceleme, kültürden daha az duyarlı bir yöntemdir (Metchock et al., 1999; Dunlap et al., 2000).

Mikobakteriler için 2 türlü aside dirençli boyama yöntemi vardır:

a) Işık mikroskobu kullanılan Karbol Fuksin yöntemi (Ziehl Neelsen ve Kinyoun boyama): Aside dirençli organizmalar kırmızı renkte görülürler.

b) Floresan mikroskobu kullanılan Auramine-rhodamine floresan boyama (Auramine O ve Auramine-rhodamine) (Dunlap et al., 2000).

a) Karbol Fuksin Yöntemi:

a.1) Ziehl-Neelsen (Sıcak Karbolfuksin) Boyama Yöntemi:

Çözeltilerin hazırlanışı;

Karbol Fuksin: 3 g bazik fuksin, %90-95'lik 10 ml etanolde çözülür, üzerine 90 ml %5'lik fenol çözeltisi eklenir (%5'lik fenol: 100 ml distile suda, 5 g fenol kristalleri çözülür).

Asit-Alkol: 97 ml %90-95'lik etanol'ün üzerine 3 ml HCl yavaşça eklenir.

Metilen Mavisi: 0,3 g metilen mavisi, 100 ml distile suda çözülür (Koneman et al., 1997).

Yöntemin uygulanışı;

- 1) Tespit edilen lam, Ziehl-Neelsen karbolfuksin boyası ile kaplanır.
- 2) Bir bek, elektrikli boyama rafı veya bir metal çubuk ucuna sarılı, etil alkole batırılıp yakılmış pamukla lam alttan yavaşça ısıtılır. Düşük ısıyla veya aralıklı ısı kullanılarak 3-5 dakika süreyle buharlaşma görülünceye kadar devam edilir. Burada dikkat edilecek nokta; boyanın kaynatılmaması ve preparatın kurumamasıdır. Eğer boya azalırsa tekrar ilave edilmelidir. Lam 5 dakika soğumaya bırakılır.
- 3) Distile su ile lam yıkanır.
- 4) %3'lük asit alkolle, lamdan artık renk akmayıncaya kadar yaymaya renk giderme işlemi uygulanır.
- 5) Distile su ile lam yıkanır.
- 6) Zıt boya metilen mavisi ile 20-30 saniye boyanır.
- 7) Distile su ile yıkanır ve kurutma sehpasına dik olarak dizilerek kurumaya bırakılır. Yayma, 100'lük immersiyon objektifi ile incelenir. Açık mavi zemin üzerinde kırmızı mikobakteriler görülür (Bkz. Şekil 2.1) (Saniç ve Çoban., 1999; Sarıgüzel., 2003).

a.2) Kinyoun Soğuk Boyama Yöntemi:

Çözeltilerin hazırlanışı;

Kinyoun Karbolfuksin: 20 ml. %90-95'lik etanolde, 4 g bazik fuksin çözülür ve üzerine 100ml %9'luk fenol eklenir (%9'luk fenol: 9 g fenol, 100 ml distile suda çözülür).

%3'lük Asit-Alkol: 97 ml %90-95'lik etanolün üzerine 3 ml HCl yavaşça eklenir.

Metilen mavisi: 0,3 g metilen mavisi, 100 ml distile suda çözülür.

Yöntemin uygulanışı;

- 1) Tespit edilen lam, Kinyoun karbolfuksin ile kaplanır. 5 dakika bekletilir ve distile su ile yıkanır.
- 2) Lam, %3'lük asit-alkolle kaplanır ve sıvı, lamdan renksiz akıncaya kadar renksizleştirilir. Lam, distile su ile yıkanır. Fazla su lamdan akıtılır.
- 3) Lam, zıt boya metilen mavisi ile kaplanır. 20-30 saniye bekletilir.
- 4) Lam, distile su ile yıkanır. Fazla su lamdan akıtılır.
- 5) Yayma havada kurutulur.

Yayma, 100'lük immersiyon objektifi ile incelenir. Mikobakteriler kırmızı, zemin ise açık mavi görülür (Saniç ve Çoban., 1999; Sarıgüzel., 2003; Koneman et al., 1997)

b) Auramin Florokrom Boyama Yöntemi:

Çözeltilerin hazırlanışı;

Fenolik Auramin: 10 ml %90-95'lik etanolde, 0,1 g auramin O çözülür. Üzerine 87 ml distile suda 3 g fenolün çözüldüğü çözelti eklenir ve kahverengi şişelerde saklanır.

Asit-Alkol: 100 ml %70'lik alkol üzerine, 0,5 ml konsantre HCl eklenir.

Potasyum Permanganat: 0,5 g potasyum permanganat 100 ml distile suda çözülür.

Yöntemin uygulanışı;

- 1) Tespit edilen lam fenolik auramin ile kaplanır ve 15 dakika beklenir.
- 2) Lam distile su ile yıkanır.
- 3) Asit-alkolle 2 dakika dekolorize edilir. Distile su ile yıkanır.
- 4) Potasyum permanganat eklenir ve 2 dakika bekletilir (4 dakikayı geçmemelidir) ve distile su ile lam yıkanır ve lam havada kurutulur. 25x objektifi ile floresan mikroskopunda incelenir. Mikobakteriler sarı, portakal renkte, zemin ise siyah olarak boyanır (Koneman et al., 1997).

Lam üzerinde toz, kristal, elyaf veya çizik bulunması, kalın yayılmış preparatlarda renk giderme işleminin kısa süreli yapılması, ince yayılmış preparatların uzun süre asit-alkol karışımında bırakılması, immersiye objektifi ve sedir (immersiye) yağının basil ile kontaminasyonu gibi yalancı pozitiflik ve negatifliğe neden olabilecek hatalardan kaçınılmalıdır (Kıyan., 1999). Uygun dekolorizasyonu engelleyip, zıt boya ile aside dirençli basilin varlığını saklayabileceğinden, kalın yayma yapılmamalıdır. Ayrıca kalın yayma, pul pul dökülerek, örneğin kaybına ve örneğin diğer lamlara taşınmasına neden olabilmektedir.

Potasyum permanganat ile zıt boyama esnasında, zaman önemli olup, daha uzun süreyle zıt boyama floresan veren basilin, floresans verme özelliğini kaybettirebilmektedir. Ayrıca, floresansın solmasını önlemek için, boyalı preparat 24 saat içinde incelenmeyecekse, florokrom boyama yapılmamalıdır.

Aside dirençli basil yaklaşık 1-10 µm uzunluğunda ve tipik olarak ince, çubuk şeklinde görülür. Bakteri, boncuk dizisi oluşturan aralıklı boyanma bölgeleri gösterebilir. *M. tuberculosis* dışında bazı mikobakteriler pleomorfik olarak görülebilir (uzun veya kokoid formda). Yaymalarda aside dirençli boyanan artefaktlar olabileceğinden, mikobakterilerin bunlardan iyi ayırt edilmesi gerekir (Sarigüzel., 2003). Ayrıca aside dirençli boyama yöntemleri *M. tuberculosis*'e özgül olmayıp, bunun dışında doğada yaygın olarak bulunan potansiyel patojen veya saprofit mikobakteriler ve bazı *Nocardia* türleri, *Legionella micdadei*, *Rhodococcus* türleri, *Cryptosporidium* kistleri, *Cyclospora* kistleri, *Isospora* ve *Microsporidia* kistleri de belirli derecelerde aside dirençli olarak boyanabilmektedir (Metchock et al., 1999).

Tüberküloz hastalarında basil salınımı düzensizdir. Bu nedenle hastadan alınan örneklerden farklı zamanlarda hazırlanan preparatların biri ARB yönünden pozitif, diğeri negatif olabilir. Tedavi gören hastaların yaymalarında basil görüldüğü halde, kültürlerinde üreme olmayabilir (Kıyan., 1999). Ayrıca laboratuvar hataları, örneklerin uzun süre dekontamine edilmesi, kısa inkübasyon şartları, yaymaların çapraz kontaminasyonu, yayma hazırlarken çeşme suyu kullanılması gibi durumlarda

yayma pozitif, kültür negatif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (Metchock et al., 1999; Dunlap et al., 2000).

Mikroskopik inceleme ile yeni olguların saptanması, tedaviye verilen yanıtın izlenmesi, ilaca dirençli olguların ortaya konması ve hastaneden taburcu etme gibi birçok konuda değerli ipuçları elde edilir. Tedavi ile önce kültür, sonra yayma negatifleşir. Tedaviye rağmen balgam yaymasındaki bakteri sayısında azalma olmaması ilaç direncini düşündürür. Bundan dolayı yaymalar dikkatli bir şekilde incelenmelidir. Yaymayı negatif olarak rapor etmeden önce, karbol fuksin boyama yöntemi ile boyanmış her yaymada en az 300 alan, florokrom boyama ile boyanmış yaymalarda ise en az 30 alan incelenmesi gereklidir.

Doğrudan boyalı yaymalarda görülen basil sayısının değerlendirilmesi ve rapor edilmesi “Centers for Disease Control (CDC)” kriterlerine göre Tablo 2.2’ de verilmiştir.

Tablo 2.2. Doğrudan boyalı yaymaların değerlendirilmesi ve rapor edilmesi (Sarigüzel., 2003; Kıyan., 1999; Koneman et al., 1997).

Aside Dirençli Basil Sayısı / Mikroskop alanı			
Sonuç	Karbol-Fuksin Boyama (1000x)	Florokrom Boyama (250x)	Florokrom Boyama (450x)
ARB görülmedi.	Negatif	Negatif	Negatif
Şüpheli (Yeni örnek ile tekrar edilmeli)	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/ 70 alan
+	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
++	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
+++	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/ 1 alan
++++	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/ 1 alan

Özellikle balgamında ARB gösterilemeyen hastalarda radyografi tüberküloz tanısında önemlidir (Luelmo., 2004).

Yaygın kullanılabilirliği, düşük maliyeti ve önemli tanısal yararı nedeniyle, balgam yaymasının mikroskopik incelemesi, akciğer tüberkülozu tanısında en önemli inceleme yöntemidir (Kocabaş., 2002).

2.4.3. Homojenizasyon ve Dekontaminasyon Yöntemleri

Mikobakterilerin araştırılması amacıyla laboratuvara gönderilen birçok klinik örnek, mikobakterilerle birlikte, kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarları ve bu mikroorganizmaların çoğunluğunun etrafını saran lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntıları da içerir. Mikobakteri dışı diğer mikroorganizmalar ve organik kalıntılar, doğrudan yayma yapılsa bile asit-alkol ile karbol fuksin gibi mikobakterilerde tutulan boyayı bıraktıkları için zıt boyanın (EZN yönteminde metilen mavisinin) rengini alırlar. Dolayısıyla mikobakterilerden farklı renkte görüldüklerinden tanıda çok fazla sorun oluşturmazlar (Uzun, 2003; <http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005). Fakat kontaminasyona neden olan bu mikroorganizmalar, mikobakterilerden çok daha kısa sürede üreyebildikleri için, besiyerlerinde mikobakterilerin üremesini baskırlar. Bu nedenle normal flora içeren ve alım ve taşıma işlemleri sırasında steril koşulların sağlanmadığı klinik örnekler besiyerlerine ekilmeden önce dekontaminasyon işlemlerine gereksinim duyarlar (Uzun., 2003).

Mikobakterilerin hücre duvarında bulunan yüksek lipit içeriği, bakteriyi kimyasalların zararlı etkilerine karşı daha dirençli kılmaktadır. Tüberküloz basilleri güçlü asit ve alkali (%4 sodyum hidroksit, %5 oksalik asit, %3 hidroklorik asit gibi) maddelere diğer mikroorganizmalardan daha dirençlidir. Bu maddeler aynı zamanda, katı veya yarı katı özellikteki örnekleri sıvılaştırarak, akıcı hale getirmektedir. Bu özelliklerinden yararlanılarak, çeşitli homojenizasyon ve dekontaminasyon yöntemleri geliştirilmiştir (Einsenstadt et al., 1995; Kıyan., 1999).

Homojenizasyon ve dekontaminasyon yöntemleri 4 farklı işlemi içermektedir.

1) Konsantrasyon: İdrar ve steril vücut sıvılarına (BOS, plevra sıvısı, vb.) balgam örneklerine göre daha az sayıda basil geçer. İzolasyon şansını arttırmak için büyük hacimlerdeki bu örnekleri, daha fazla mikobakteri içeren daha küçük hacimler haline

getirmek gerekir. Bu amaçla bu tür örnekler öncelikle 3000-4000 devirde 15-20 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülür. Sonraki işlemler elde edilen bu çökelti üzerinden yürütülür. Santrifüj ile çöktürme, homojenizasyon-dekontaminasyonun değişik basamaklarında, örnek üzerine eklenen sıvılardan dolayı hacmi artan örneği konsantre etmek için de uygulanır.

2) Homojenizasyon: Balgam, açlık mide sıvısı ve biyopsi örnekleri gibi mukus, epitel ve diğer şekilli elamanları içeren örneklerde, bu yapılar arasında gizlenmiş olan basilleri ortaya çıkarmak için uygulanır. Mikobakteri içerdiği düşünülen klinik örnekleri homojen hale getirmek için genellikle NaOH (sodyum hidroksit) ya da N-asetil-L- sistein (NALC) gibi kimyasal maddeler kullanılır. Bu maddeler sayesinde mukus proteinleri erir, ökaryotik hücreler parçalanır, bu yapılar arasına hapis olmuş basiller ortaya çıkar. Homojen bir sıvı haline gelen ve akışkanlığı artan örnekte santrifüj ile basillerin çöktürülmesi kolaylaşır.

3) Dekontaminasyon: Balgam, açlık mide sıvısı, idrar gibi klinik örnekler izole edilmeye çalışılan mikobakteriler yanında alındıkları anatomik bölgeye özgü flora üyelerini (bakteri, maya hücreleri vb.) de barındırırlar. Bu kontaminant mikroorganizmalar kültür aşamasında mikobakterilere göre daha hızlı ve daha bol miktarda üreyeceklerinden mikobakterilerin üremesini engellerler. Kontaminant mikroorganizmaların üremesiyle besiyerindeki besin öğeleri tükeneceğinden ya da besiyeri yapısı bozulacağından (örneğin pH'ı değişeceğinden) mikobakterilerin üremesine fırsat olmaz. Bu nedenle klinik örnekler NaOH, oksalik asit, sülfürik asit gibi kimyasal maddelerle muamele edilerek kontaminant mikroorganizmalar öldürülmeye çalışılır.

4) Nötralizasyon: Mikobakteriler genellikle pH 6-8' de iyi ürerler. İdrar, açlık mide sıvısı gibi bazı örnekler doğal yapıları nedeni ile asidik bir yapı göstermekle birlikte diğer klinik örnekler de homojenizasyon-dekontaminasyon işlemleri esnasında kullanılan kimyasal maddelerden dolayı asidik ya da alkali bir yapı kazanırlar. Bu nedenle kültür besiyerlerine ekim, biyomoleküler testler gibi çalışmalardan önce klinik örneğin pH'ı 6-8 düzeylerine ayarlanmalıdır. Nötralizasyon amacı ile fosfat tampon çözeltisi ya da brom-timol mavisi, fenol kırmızısı gibi bir ayıraç eşliğinde

asit (hidroklorik asit, sülfürik asit vb.) ve alkali çözeltiler (NaOH vb.) kullanılır (<http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005).

Homojenizasyon- Dekontaminasyon işlemlerinde dikkat edilmesi gereken noktalar;

1) Yaygın olarak kullanılmakta olan sindirici ve dekontamine edici kimyasallar, kısmen de olsa tüberküloz basili için de toksiktir. Bu nedenle homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri incelenecek örneğe göre seçilmeli, gerektiğinde amacından sapmayacak şekilde küçük değişiklikler yapılarak, örneklerdeki mikobakterilere zarar verilmesi mümkün olduğunca en aza indirilmelidir. Çünkü uygun olmayan homojenizasyon dekontaminasyon yöntemleri klinik örneklerdeki mikobakterilerin %20-90'ını öldürebilmektedir (WHO/TB/98.258., 1998).

2) Homojenizasyon- dekontaminasyon yöntemlerinin çoğunluğunda mukolitik ve dekontaminant aktivite için kullanılan kimyasal madde NaOH'dir. NaOH, istenmeyen mikroorganizmaların öldürülmesinde oldukça etkili bir madde olmakla birlikte mikobakteriler için de süreye bağlı ölümcül etki göstermektedir. Bu nedenle klinik örneğin bu maddeyle karşılaşması sınırlı yoğunlukta ve sürede olmalıdır. Yapılan çalışmalarda eşit miktarlarda karıştırılan %2-4'lük NaOH ile balgam örneklerinin işleme süresinin (santrifüj işlemi dahil) en fazla 30 dakika olması gerektiği saptanmıştır. Çünkü NaOH ile karşılaşma süresinin uzaması, NaOH yoğunluğunun artışına göre daha fazla zarar vermektedir. Bu nedenle aşırı kontamine olmayan klinik örneğin dekontaminasyonu için 15-30 dakikalık süre yeterli olup, aşırı kontamine örnek söz konusu olduğunda, sürenin uzatılmasındansa, NaOH'in son yoğunluğunun %3-4'e çıkartılması yeğ tutulmalıdır. Burada dikkat edilmesi gereken diğer bir nokta da, 37 °C'de NaOH mikobakterilere daha etkili olduğu için, bekletme süreci oda sıcaklığında yapılmalıdır (Bilgehan., 2002; <http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005).

3) Homojenizasyon- dekontaminasyon işlemlerinden geçirilerek yapılmış kültürlerde %2-5 oranında kontaminasyon olağan karşılanmaktadır. Bu nedenle bu kültür kontaminasyonu oranı, sterilite koşullarına tam olarak uyulduğu varsayıldığında, aynı zamanda laboratuvarın kullandığı homojenizasyon-

dekontaminasyon yönteminin etkinliğini de göstermektedir. %2'den daha düşük oranlar ise homojenizasyon- dekontaminasyon yönteminin gereğinden fazla şiddetli olduğuna, %5'ten fazla oranlar ise yetersiz düzeyde olduğuna işaret eder. Bu gibi durumlarda yapılacak değişikliklerden biri kullanılan NaOH yoğunluğunu değiştirmektir. Kontaminasyonun yüksek olduğu durumlarda başlangıçta kullanılan NaOH yoğunluğu %6'lara, kontaminasyonun düşük olduğu durumlarda ise %2 'lere çekilebilir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta NaOH yoğunluğu ne olursa olsun klinik örneğin bu kimyasal çözelti ile karşılaşma süresinin (santrifüj dahil) en fazla 30 dakika olmasıdır (<http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005).

4) Mikobakteriler, hücre duvar yapıları lipitten zengin olduğu için genellikle bulunduğu sıvının üst katmanlarında (yüzeyinde) yerleşme eğilimindedirler. Bu nedenle santrifüjle çevrildiği sırada tüpün dibine kolaylıkla çökmezler. Bu nedenle, yüksek devirde santrifüj edilmeli, bağıl (relatif) merkezkaç kuvveti (RCF) 3000xg'ye erişmelidir. Eğer bağıl merkezkaç kuvveti değeri yeteri kadar yüksek değilse, tüberküloz basillerinin birçoğu süspansiyonda kalarak, üst sıvı (supernatant) ile beraber atılır. Yapılan çalışmalar neticesinde 3000xg'de 15 dakika santrifüjleme ile mikobakterilerin %95'inin çöktürde kaldığı görülmüştür. Mikobakteriyoloji laboratuvarlarında soğutmalı santrifüj cihazları tercih edilmelidir. Çünkü santrifüj sırasında oluşan ısı artışı mikobakterilerin kaybını artırmaktadır (WHO/TB/98.258; 1998; <http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005).

5) Karışımın vortex tipi karıştırıcı ile yapılması ile homojenizasyon işlemi hızlanır ve örnek mümkün olduğu kadar çözülür. Bu işlemlerin hepsi, biyolojik güvenlik kabinlerinde yapılmalıdır. Karıştırmalarda tüpün içinde oluşan aerosol ve köpüklenmenin, tüpün kapağı açıldığında sağa sola yayılmalarını önlemek için, karıştırmanın sürenin başlangıcında yapılması, sonra 15 dakika beklendikten sonra kapağın açılması gerekmektedir. Bulaşıcı etken içeren tüplerle çalışırken eğer tıkaç kullanılıyorsa, tıkaçların her açılış ve kapatılışında tüp kenarlarının alkol ile silinmeleri, alkol kuruduktan sonra alevden geçirilmeleri ve atılacak kontamine sıvıların, içerisinde %5'lik fenol bulunan çözeltiliye atılması önemlidir (Bilgehan., 2002).

6) Homojenizasyon- dekontaminasyon uygulamalarında kullanılacak araç-gereçler ve kimyasal çözeltiler daima steril olmalıdır. Kültür kontaminasyon oranlarında artış meydana geldiğinde öncelikle steriliteden şüphe etmek gerekir. Çoğu zaman kontaminasyon kaynağını bulmak güç olmakta ya da uzun zaman almaktadır. Günlük işlemlerin aksamaması için yapılması gereken en iyi şey uygulama sırasında kullanılmakta olan malzemelerin (çözeltiler ve diğer sıvılar, besiyerleri, pipetler vb) iptal edilip, sterilite koşullarını bir kez daha gözden geçirdikten sonra, yenilerinin hazırlanmasıdır. Homojenizasyon-dekontaminasyon işleminde değişiklikler ancak sterilite için gerekenler yapıldıktan sonra sorun çözülmedi ise düşünülmelidir (<http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005).

7) Klinik örneğin türüne göre homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi uygulanmalıdır. Ayrıca, yöntemlerde kullanılan maddelerin çok pahalı olmaması ve kolay erişilebilir olması da kullanılan yöntemin seçiminde önemli etmenlerden biridir (Rieder et al., 1998).

8) Tüberkülozun en sık görülen şekli akciğer tüberkülozu olduğu için, tanıda sıklıkla incelenmesi istenen örnek balgamdır. Balgam örnekleri, ağız florasında yer alan mikroorganizmalarla yoğun bir şekilde kontamine olduğundan, bu örneklerle homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi uygulamak gerekmektedir. BAL sıvısı genellikle steril olmayan bronkoskoplar ve kataterler ile alınmaktadır. Bu sıvı, korunmuş fırça (protected brush) sistemi ile alınmadığı sürece başka organizmalarla kontamine kabul edilmeli ve dekontaminasyon işlemi uygulanmalıdır. İdrar örnekleri, deri florası ile kontamine olduğundan mutlaka homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi uygulanmalıdır. Laringeal eküvyon, abse, açlık mide sıvısı, dışkı gibi örnekler mikobakteriler yanında kontaminant bakterileri de içerdiğinden homojenizasyon-dekontaminasyon işleminden sonra kültür yapılmalıdır (<http://www.salubrisinc.com/medicaproductline.html>, 2005).

Normal şartlarda steril olan örnekler (BOS, plevra sıvısı, periton sıvısı gibi steril vücut sıvıları ile steril şartlarda alınan ve parçlama-ezme işleminden geçirilmiş biyopsi örnekleri vb.) işleminden geçirilmeden doğrudan ekilebilir. Fakat büyük hacimdeki örneklerde, ekim yapılırken kullanılan örnek miktarı çok az olduğundan ve bu örneklerde birim başına düşen mikobakteri sayısının zaten oldukça az olduğu

düşünüldüğünde izolasyon şansı azalır. Bu nedenle bu örnekler santrifüj edilerek konsantre bir hale getirildikten sonra ekilmelidir.

Dünya genelinde çok sayıda homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi tanımlanmıştır. Bunların çoğunluğu, akciğer tüberkülozu tanısı amacıyla balgam örneklerini temel alan, küçük ve büyük ölçekli laboratuvarlarda rahatlıkla uygulanabilmesi amacı ile geliştirilmiş yöntemlerdir. Yöntemlerde farklı kimyasal malzemeler ile laboratuvar alet ve cihazları kullanılmasına rağmen, bu yöntemler hep aynı amaca hizmet eder. Hiçbir yöntem her laboratuvarı uygulanabilecek ideal bir yöntem değildir. Her birinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır. Mikobakteri izole etmeye çalışan laboratuvar, laboratuvarında yer alan biyogüvenlik koşulları, laboratuvarın donanımı (alet, cihaz, kimyasal malzemenin sorunsuz sağlanması, vb.), günlük çalışma yükü, deneyimli ve yeterli sayıda personel gibi ölçütleri dikkate alarak kendine en uygun yöntemi seçmelidir (<http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005).

En yaygın kullanılan homojenizasyon- dekontaminasyon yöntemleri;

- 1) Petroff'un NaOH yöntemi (%2-4 NaOH)
- 2) Dünya Sağlık Örgütü' nün önerdiği Modifiye Petroff yöntemi (%4 NaOH)
- 3) NaOH yöntemi (%2- 4 NaOH)
- 4) N-asetil-L-sistein-NaOH (NALC-NaOH) yöntemi
- 5) Zefiran-Trisodyum-Fosfat (Z-TSP) yöntemi
- 6) Oksalik Asit yöntemi
- 7) Setilpiridinyum Klorid-Sodyum Klorid (CPC) yöntemi
- 8) Sülfirik asit yöntemi

Son yıllarda Sodyum dodesil sülfat-sodyum hidroksit, C18-karboksipropilbetain (CB-18) ile de çalışmalar yapılmakta ve sonuçlar değerlendirilmektedir (Uzun., 2003).

2.4.3.1. Petroff'un NaOH Yöntemi

1915 yılında Petroff, NaOH'i uygulamaya sokmuştur. Bu yöntemin modifiye edilmiş uygulamaları bulunmaktadır. Orjinal Petroff yönteminde yıkama işlemi yapılmamakta ve ayıraç yardımıyla (brom-timol mavisi veya fenol kırmızısı), asit eklenerek (%15'lik sülfürik asit veya hidroklorik asit) nötralizasyon yapılmaktadır. Sindirici ve dekontaminant %2-4 NaOH'dir (Saniç ve Çoban., 1999; Chadwick., 1982).

Çözeltilerin hazırlanışı

NaOH çözeltisi (%2- 4 NaOH)

NaOH distile suda istenilen konsantrasyonda çözülür (%2'lik için 2g / 100 ml veya %4'lük için 4g / 100 ml). Otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edilir. Tercihen buzdolabında ya da oda sıcaklığında saklanır.

2 N HCl çözeltisi

%36- 37' lik HCl (konsantre HCl) 33 ml

Distile su 200 ml

33 ml HCl, 200 ml distile suya yavaş yavaş eklenir; otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edilir.

Fenol kırmızısı ayıraç çözeltisi

Fenol kırmızısı 8 mg

%4 NaOH çözeltisi 20 ml

Steril distile su 1000 ml

Toz halindeki fenol kırmızısı, NaOH çözeltisi içinde (manyetik karıştırıcıda) eritilir. Gerekirse hafifçe ısıtılabilir. Sonra bu sıvı steril distile su bulunan kaba aktarılır.

Uygulama

- 1) 50 ml' lik, burgu kapaklı, polipropilen yapıda steril tek kullanımlık tüplere alınan 10 ml örnek üzerine eşit miktarda uygun NaOH çözeltisi eklenir.
- 2) Mekanik karıştırıcıda 5 dakika kuvvetlice karıştırılır veya test tüpündeki karışımın 15 dakika bekletilerek karıştırılması tercih edilir.
- 3) ≥ 3000 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüj edilir.

- 4) Santrifüjden sonra üst sıvı dezenfektan içeren kaba dökülür ve çökelti HCl ile nötralize edilir. Her birine bir damla ayıraç çözeltisini takiben damlalıkla HCl ilave edilerek, ayıraç sarıdan kırmızıya dönünceye kadar HCl eklenir.
- 5) Çökelti tekrar süspanse edilip karıştırılır ve kültür besiyerine ekilir.
- 6) Yayma hazırlanır, havada kurutulur, tespit edilir, boyanır ve incelenir (Saniç ve Çoban., 1999; Isenberg., 1992).

2.4.3.2. Dünya Sağlık Örgütü' nün Önerdiği Modifiye Petroff Yöntemi

Bu yöntem, gelişmekte olan ülkelerde uygulama kolaylığı, kullanılan ayıraçların kolay sağlanabilirliği nedeni ile özellikle balgam örneklerinin dekontaminasyon işleminde kullanılan, Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen yöntemdir. Bu yöntem basit ve ucuz olmasının yanısıra, tek bir örneğin çalışılması 1 saati almaktadır. Buna göre 20 örneğin çalışılması (santrifüj cihazının kapasitesine bağlı olarak) yaklaşık 2 saat sürmektedir. Ayrıca hazırlanan NaOH çözeltisi, plastik şişelerde birkaç hafta depolanabilir, NaOH' in günlük hazırlanması gerekmez. Petroff yönteminden farklı olarak bu yöntemde klinik örneğin 2 katı kadar %4' lük NaOH eklenmektedir. NaOH, genellikle istenilen düzeyde etkili mukolitik ve dekontaminant özellikte bir kimyasal olduğu için avantaj sağlar. Fakat yoğun konsantrasyonda kullanıldığında ve işlem süresi uzatıldığında bol miktarda mikobakteri kaybına yol açabilmektedir. Nitekim bu yöntemde (santrifüj içinde ısı artışı gibi diğer çevresel etkenlere de bağlı olarak) tüberküloz basilinin kaybı %60'a kadar yükselebilmektedir. Bu yöntemde; %4'lük NaOH çözeltisi dekontaminant ve mukolitik etken olarak, steril distile su veya steril tuzlu su (% 0,85 NaCl) ise NaOH' in etkisini sınırlandırmak üzere klinik örneği seyreltmek için kullanılır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün "Laboratory Services in Tuberculosis Control" kitabında özellikle balgam örneklerinin dekontaminasyon işleminde öngörülen Modifiye Petroff yöntemi aşağıdaki şekildedir.

Çözeltilerin hazırlanışı

%4'lük NaOH çözeltisi

NaOH 4 g

Distile su 100 ml.

NaOH tartılır ve distile suda eritilir ve 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.

Steril tuzlu su: (% 0,85 NaCl)

NaCl 0,85 g

Distile su 100 ml

NaCl, distile su içinde eritilir ve 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.

Uygulama

- 1) Balgamın iki katı kadar %4’lük NaOH eklenir. Tüpün kapağı kapatılarak çalkalanır.
- 2) 15 dakika oda sıcaklığında tutulur. Ara sıra tüp alt üst edilerek çalkalanır.
- 3) ≥ 3000 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüj edilir.
- 4) Üst sıvı dezenfektan içeren kaba dökülür.
- 5) 15 ml steril tuzlu su veya steril distile su eklenir.
- 6) 3000 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüj edilir.
- 7) Üst sıvı dezenfektan içeren kaba dökülür. Çökeltiden besiyerine ekim yapılır. Yayma hazırlanır, tespit edilerek boyanır ve incelenir (WHO/TB/98.258., 1998).

2.4.3.3. NaOH Yöntemi (%2- 4 NaOH)

Özellikle balgam örneklerinin homojenizasyon-dekontaminasyonunda Petroff yönteminin modifiye edilmiş uygulama şekillerinden biri olan ve ülkemizde de kullanılan bu yöntemde; %4’lük NaOH ya da %2’ lik NaOH dekontaminant olarak, fosfat tampon çözeltisi ya da distile su klinik örneği seyreltmek için, sığır albümin fraksiyon V çözeltisi mikobakterilerin katı besiyerine adezyonunu arttırmak için, fenol kırmızısı ayıraç çözeltisi ve HCl klinik örneği nötralize etmek için kullanılır. NaOH’in son konsantrasyonunun %2 olması tercih edilir. Ancak dışkı gibi çok kontamine örneklerde %6’lık NaOH kullanılarak son konsantrasyon %3’e ayarlanabilir. Yüksek oranda kontaminasyon durumunda süreyi uzatmak yerine NaOH’ in konsantrasyonu %3-4’ e çıkartılabilir. (Kıyan., 1999; <http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler>., 2005).

Çözeltilerin hazırlanışı

NaOH çözeltisi (%2-4)

%2 NaOH çözeltisi;

NaOH 2g

Distile su 100 ml

%4 NaOH çözeltisi;

NaOH 4 g

Distile su 100 ml

NaOH, distile suda istenilen konsantrasyonda çözülür. 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.

% 0,2 sığır albümin fraksiyon V çözeltisi

Stok %2 sığır abumin çözeltisi:

NaCl 0,85 g

Sığır albümin fraksiyon V 2 g

Distile su 100 ml

100 ml distile suda 0,85 g NaCl çözülür ve üzerine 2 g sığır albümin fraksiyon V yavaş yavaş eklenir. İyice karıştırılır (karıştırma işlemlerinde çalkalamaktan kaçınılmalıdır). %4’lük NaOH ile pH 6,8’e ayarlanır. 0,45 mm por çaplı membran fitrelerden geçirilerek sterilize edilir.

%0,2 çalışma çözeltisi hazırlamak için;

Stok %2 sığır albümin çözeltisi 1 birim

Steril %0,85 NaCl çözeltisi 9 birim

olacak şekilde 1:10 oranında karıştırılarak %0,2’lik sığır albümin fraksiyon V çözeltisi hazırlanır.

2 N HCl çözeltisi

%36- 37’ lik HCl (konsantre HCl) 33 ml

Distile su 200 ml

33 ml HCl, 200 ml distile suya yavaş yavaş eklenir; otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edilir.

0,067 M Fosfat tampon çözeltisi (pH: 6,8)

A çözeltisi: Stok bazik çözelti:

Na ₂ HPO ₄ (anhidrit)	9,47 g
Distile Su	1000 ml

1 litre suda 9,47 g Na₂ HPO₄ çözülür.

B çözeltisi: Stok asit çözelti:

KH ₂ PO ₄	9,07 g
Distile su	1000 ml

1 litre suda 9,07 g KH₂ PO₄ çözülür.

A ve B çözeltileri ayrı ayrı hazırlandıktan sonra, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Çalışma çözeltisi: Eşit miktar A ve B çözeltileri karıştırılır. pH 6,8'e ayarlanır. Karışımın pH'sı 6,8'den daha düşükse bir miktar daha A çözeltisi, yüksekse B çözeltisi eklenerek pH ayarlanabilir (Isenberg.,1992).

Fenol kırmızısı ayıraç çözeltisi

Fenol kırmızısı	8 mg
%4 NaOH çözeltisi	20 ml
Steril distile su	1000 ml

Toz halindeki fenol kırmızısı NaOH çözeltisi içinde (manyetik karıştırıcıda) çözülür. Gerekirse hafifçe ısıtılabilir. Sonra bu sıvı steril distile su bulunan kaba aktarılır.

Uygulama

- 1) En fazla 10 ml olacak şekilde, steril 50 ml'lik konik plastik santrifüj tüpüne klinik örnek konulur. Üzerine eşit miktarda NaOH çözeltisi eklenir.
- 2) Vorteks karıştırıcı ile tüp çalkalanır ve 15 dakika oda sıcaklığında (20-25°C) veya kuvvetli mekanik karıştırıcıda 15 dakika bekletilir.
- 3) Tüpün üzerindeki 50 ml çizgisine kadar steril distile su veya steril 0,067 M fosfat tampon çözeltisi (pH 6,8) doldurularak karışım seyreltilir. Amaç, devam eden NaOH aktivitesinin azaltılıp, karışımındaki yoğunluğunu düşürmektir. Karışım alt üst edilerek, içerik karıştırılır.
- 4) ≥ 3000 devir/dakika hızla 15-20 dakika santrifüj edilir. Üst sıvı uygun dezenfektan içeren kaba dökülür.
- 5) Çökeltiye birkaç damla fenol kırmızısı ayıraç çözeltisinden ve ardından renk sarıya dönüşüncüye kadar 2 N HCl çözeltisinden damlatılır.

6) Çökeltiden ekim yapılacağı zaman 1-2 ml steril %0,85 NaCl, steril distile su, fosfat tampon çözeltisi, %0,2 sığır albümin fraksiyon V çözeltilerinden biri çökeltiyeye eklenerek vortekslenir, yayma hazırlanır ve kültüre ekilir (Metchock et al., 1999; Isenberg., 1992; <http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005).

2.4.3.4. N-Asetil-L-Sistein NaOH (NALC-NaOH) Yöntemi

Mukolitik ajan olan NALC balgamın hızlı sindirimi için kullanılır. NaOH balgamda düşük bir konsantrasyonda (%1-2) kullanılır (Saniç ve Çoban., 1999; Isenberg., 1992). Bu yöntemde NALC mukolitik, NaOH dekontaminant ve %2,9'luk sodyum sitrat, klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak, NALC'in inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır (Uzun., 2003).

Hastalardan alınan örneklerde genellikle az sayıda mikobakteri bulunduğu için santrifüj ederek bunları çöktürmek ve böylece daha küçük bir hacimde toplamak (konsantrasyon) tanı yöntemlerinin duyarlılıklarını önemli ölçüde arttırdığı için mutlaka yapılması gereken bir işlemdir. Balgam, akışkanlığı çok düşük bir örnek olduğu için doğrudan santrifüj edildiğinde bakterilerin çökmesine izin vermez. Bu nedenle önce balgamın sıvılaştırılması gerekir. Dekontaminasyon amacı ile kullanılan NaOH, mukus proteinlerinin bir çoğunu denatüre ettiği için balgamın sıvılaşmasını önemli ölçüde sağlar. Ancak tam sıvılaşma için yüksek konsantrasyonda NaOH gerekir. Konsantrasyon yükseldikçe, dekontamine edilmek istenen organizmaların yanısıra mikobakteriler de ölmeye başlar. Ortama NALC gibi indirgeyici bir madde eklenmesi, mukus proteinlerinin S-S bağlarının açılması ile sıvılaşmayı kolaylaştırdığından daha düşük konsantrasyonda NaOH ile dekontaminasyon yapılmasına olanak vererek, santrifüj işlemi sırasında tüberküloz basillerinin kolayca çöktürülerek yoğunlaştırılmasını sağlar (<http://www.salubrisinc.com/medicaproductline.html>, 2005).

Bu yöntemde, NaOH'li çözelti eklendiği zaman balgam ve diğer klinik örnekler alkali hale gelir ve bu ortamda tüberküloz basilleri çok uzun süre bırakılırlarsa, canlılıklarını yitirirler. Bu nedenle dekontaminasyon ve yoğunlaştırma işlemlerini 20 dakikadan fazla sürdürmemek ve işlemin hemen sonrasında fosfat

tampon çözeltisi ile pH'ı nötralize etmek gerekmektedir (<http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005).

Çözeltilerin hazırlanması

NaOH-sodyum sitrat stok çözeltisi

%4'lük NaOH:

40 g NaOH, 1000 ml distile suda eritilerek hazırlanır.

%2,9'luk Trisodyum sitrat:

Sodyum sitrat dihidrat 29 g

(veya sodyum sitrat, anhidrit 26 g)

Distile su 1000 ml

Sodyum sitrat, distile suda eritilerek hazırlanır. Eşit miktar %2,9' luk trisodyum sitrat ve %4' lük NaOH karıştırılır ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir (Isenberg., 1992).

NALC- NaOH çalışma çözeltilerinin hazırlanması

Çalışmadan hemen önce NaOH-Sodyum sitrat çözeltisine Tablo 2.3'te belirtilen miktarda NALC eklenir ve iyice karıştırılır (Saniç ve Çoban., 1999).

Tablo 2.3. NALC-NaOH çözeltisinin hazırlanması (Saniç ve Çoban., 1999).

Gerekli çözelti miktarı (ml)	Karıştırılacak miktar (ml).		Eklenecek NALC (g)
	%4'lük NaOH	%2,9'luk trisodyum sitrat	
50	25	25	0,25
100	50	50	0,50
200	100	100	1,00
500	250	250	2,50
1000	500	500	5,00

NALC, oksijene duyarlı olduğu için NALC eklenmiş çözelti, aktivitesini en fazla 24 saate kadar korur. Bu nedenle ertesi güne kalan çözelti kullanılmamalı, atılmalıdır. Ayrıca NALC'in tartım işlemleri sırasında ambalajın ağzı uzun süre açık bırakılmamalıdır, israf olmaması için çalışmaya alınacak klinik örnek sayısına göre

kullanılacak NaOH-Sodyum sitrat çözeltisi miktarı belirlenmeli sonra da uygun miktarda NALC eklenmelidir (<http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005; Uzun., 2003)

0,067 M Fosfat tampon çözeltisi (pH: 6,8)

A çözeltisi: Stok bazik çözelti

Na ₂ HPO ₄ (anhidrit)	9,47 g
Distile Su	1000 ml

1 litre suda 9,47 g Na₂ HPO₄ çözülür.

B çözeltisi: Stok asit çözelti

KH ₂ PO ₄	9,07 g
Distile su	1000 ml

1 litre suda 9,07 g KH₂ PO₄ çözülür.

A ve B çözeltileri ayrı ayrı hazırlandıktan sonra, otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilir.

Çalışma çözeltisi: Eşit miktar A ve B çözeltileri karıştırılır. pH 6,8’e ayarlanır. Karışımın pH’sı 6,8’den daha düşükse bir miktar daha A çözeltisi, yüksekse B çözeltisi eklenerek pH ayarlanabilir (Isenberg.,1992).

Fosfat tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra da sterilize edilebilir. Fosfat tampon çözeltisi oldukça kolay kontamine olan ve bekletildiğinde içinde mikroorganizmaları üreten bir çözelti olduğundan, kültürlerin kolaylıkla kontamine olmasına yol açabilir. Bu nedenle çözelti, her merkezin gereksinimine göre şişelere bölünüp, otoklavlanmalı ve her gün yaklaşık 1 şişe bitirilecek şekilde hazırlık yapılmalıdır. Bir gün açılıp kullanılan şişeden arta kalan tampon çözelti olursa, dökülmeli bir sonraki günde bu tampon çözelti kesinlikle kullanılmamalıdır (<http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005).

% 0,2 sığır albümin fraksiyon V çözeltisi

Stok %2 sığır abümin çözeltisi:

NaCl	0,85 g
Sığır albümin fraksiyon V	2 g
Distile su	100 ml

100 ml distile suda 0,85 g NaCl çözülür ve üzerine 2 g sığır albümin fraksiyon V yavaş yavaş eklenir. İyice karıştırılır (karıştırma işlemlerinde çalkalamaktan kaçınılmalıdır). %4 NaOH ile pH 6,8'e ayarlanır. 0,45 mm por çaplı membran fitrelerden geçirilerek sterilize edilir.

%0,2 çalışma çözeltisi hazırlamak için;

Stok %2 sığır albümin çözeltisi 1 birim

Steril %0,85 NaCl çözeltisi 9 birim

olacak şekilde 1:10 oranında karıştırılarak %0,2'lik sığır albümin fraksiyon V çözeltisi hazırlanır.

Uygulama

- 1) 50 ml'lik plastik santrifüj tüpüne (steril, burgulu kapaklı tüpler, falkon tüpü) en fazla 10 ml olacak şekilde örnek konulur, üzerine örneğin miktarı kadar NALC-NaOH çözeltisi eklenir.
- 2) Bekleme süresinin başlangıcında tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslenir. 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Bu süre zarfında ara sıra el ile tüpler çalkalanır.
- 3) Süre tamamlandığında tüpün 50 ml çizgisine kadar 0,067 M fosfat tampon çözeltisi (pH 6,8) eklenerek nötralizasyon sağlanır ve dekontaminasyon işlemi durdurulur.
- 4) Fosfat tampon çözeltisi eklenmiş tüpler bakteri yoğunluğunu arttırmak için ≥ 3000 devir/dakika hızla 15-20 dakika santrifüj edilir.
- 5) Santrifüj sonrasında, üst sıvı uygun dezenfektan (%0,1-1 sodyum hipoklorit, %70 alkol, %5 fenol vs.) içeren kaba boşaltılır ve çökteltiyel-2 ml steril fosfat tampon çözeltisi (pH 6,8) veya steril %0,2 sığır albümin fraksiyon V çözeltisi eklenir. Vortekslenir ve bu işlem tamamlandıktan sonra yayma yapılır ve uygun kültür ortamına ekim yapılır (Koneman et al., 1997; Isenberg., 1992).

Çeşitli klinik örneklerle uygunlanabilirliği ve Bactec ve diğer ticari kültür sistemlerine ekimden önce örneklerin işlenmesi için uygun olan NALC-%2 NaOH yöntemi günümüzde en yaygın kullanılan dekontaminasyon yöntemlerinden biridir (Metchock et al., 1999). Bu yöntemi uygularken oksidasyonu ve asetil sistein inaktivasyonunu azaltmak için aşırı çalkalamaktan kaçınılmalıdır (Saniç ve Çoban., 1999). Mukus yoğunluğu olan klinik örneklerde NALC miktarı arttırılabilir.

Özellikle kistik fibrozisli hastaların pulmoner sekresyonlarında, *Pseudomonas aeruginosa* üremesinin önlenmesi için NALC-NaOH işlemini takiben %5 oksalik asit uygulaması dekontaminasyonu artırır. Ayrıca (antibiyotik ve antimikotik içeren) seçici besiyerleri kullanılarak da katı dekontaminasyon yöntemlerinin kullanımı sınırlandırılabilir (Metchock et al., 1999).

NALC-NaOH yöntemi gastrik lavaj, dışkı, doku örneklerinde, idrar ve diğer vücut sıvılarının işlenmesinde de kullanılır. Gastrik lavaj örnekleri ve diğer vücut sıvılarının nötralizasyonu için, 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınan örnekler ≥ 3000 devir/dakika hızla 30 dakika santrifüj edilir. Üst sıvı atılır ve çökteltiye 2-5 ml steril distile su eklenir ve balgam örneklerinde uygulandığı gibi dekontaminasyon yöntemi uygulanır (Mehtchock et al., 1999).

2.4.3.5. Zefiran-Trisodyum Fosfat (Z-TSP) Yöntemi

Z-TSP'nin kullanımı diğer homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemlerinden farklı olup, bu yöntemde, dekontaminasyon zamanı kritik değildir. Zefiran (benzalkonyum klorit), trisodyum fosfat ile seçici olarak klinik örnekteki kontaminant mikroorganizmaları öldürür, fakat tüberküloz basiline karşı etkisi azdır. Zefiran, mikobakterilere karşı bakteriyostatik olduğundan santrifüj sonrası sedimentte arta kalan zefiran agar bazlı besiyerine (Middlebrook 7H10 veya 7H11) ekilmeden önce fosfat tampon çözeltisi veya distile su tarafından mutlaka nötralize edilmelidir. Ayrıca agar bazlı besiyerine ekimden önce sedimente eklenen fosfolipid (asolektin, purifiye soya fosfatid vb.) ile de zefiranın bakteriyostatik etkisi önlenabilmektedir. Yumurta bazlı besiyeri, bakteriyostatik etkiyi nötralize eden fosfolipitler içerir. Bu nedenle yumurta bazlı besiyerine ekimden önce fosfolipid eklenmez. Bu homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminin uygulanması Bactec sistemi için uygun değildir (Metchock et al., 1999; Isenberg., 1992).

Çözeltilerin hazırlanışı

Zefiran-Trisodyum Fosfat (Z-TSP) çözeltisi

1 kg trisodyumfosfat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 4 litre sıcak distile suda çözülür. Üzerine 7,5 ml zefiran eklenir (%17'lik) (Winthrop Laboratories, New York, N.Y.) iyice

kariştırılıp oda sıcaklığında saklanır.

Nötraliye edici tampon çözeltilisi, pH: 6,6

A çözeltilisi: Stok bazik çözeltili

Na ₂ HPO ₄ (anhidrit)	9,47 g
Distile Su	1000 ml

1 litre suda 9,47 g Na₂ HPO₄ çözölür.

B çözeltilisi: Stok asit çözeltili

KH ₂ PO ₄	9,07 g
Distile su	1000 ml

1 litre suda 9,07 g KH₂ PO₄ çözölür.

A ve B çözeltileri ayrı ayrı hazırlanır. 37,5 ml disodyum fosfat (Na₂HPO₄) tamponu ile 62,5 ml monopotasyum fosfat (KH₂PO₄) tamponu kariştırılır ve pH ayarlanır. Bu karişım otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilir ve oda sıcaklığında saklanır (Metchock et al., 1999).

Uygulama

- 1) 50 ml’lik plastik santriföl tüpüne an fazla 10 ml olacak şekilde klinik örnek konulur. Üzerine eşit miktarda Z-TSP çözeltilisi eklenir.
- 2) Tüpün kapağı kapatılarak 30 dakika mekanik kariştırıcıda kariştırılır.
- 3) 20-30 dakika oda sıcaklığında (20-25°C) dik tutulup sallamadan bekletilir.
- 4) 15-20 dakika ≥ 3000 devir/dakika hızla santriföl edilir.
- 5) Santiföljden sonra üst sıvı atılır ve çökeltiye 20 ml pH 6,6 nötraliyan tampon çözeltili eklenir. Vorteks ile 30 saniye kariştırılır (Nötraliyan tampon çözeltili zefiran’ın etkisini etkisiz hale getirir).
- 6) ≥ 3000 devir/dakika hızla 15-20 dakika santriföl edilir.
- 7) Üst sıvı atılır. Çökelti pipetle kariştırılır. Yumurta bazlı besiyerine (Löwenstein Jensen vb.) ekilir ve yayma yapılır. Eğer çökelti, agar bazlı besiyerine ekilecekse nötraliye edici olarak lesitin kullanılmalıdır (Metchock et al., 1999).

2.4.3.6. Sülfürik Asit Yöntemi

Bu yöntem, alkali sindirici kullanıldıktan sonra, idrar veya diğer vücut sıvılarının sürekli kültür kontaminasyonlarında bazen yardımcı olabilir (WHO/TB/98.258., 1998; Saniç ve Çoban., 1999; Metchock et al., 1999).

Çözeltiler

%4 sülfürik asit

%4 NaOH

Steril distile su

Fenol kırmızısı ayırıcı

Uygulama

- 1) Klinik örneğin tümü ≥ 3000 devir/dakika hızla 30 dakika santrifüj edilir. Burada birkaç tane tüp gerekebilir.
- 2) Üst sıvı süzülür ve eğer birkaç santrifüj tüpü tek örnek için kullanılmış ise çökelti toplanır.
- 3) Eşit miktarda %4'lük sülfürik asit çözeltisi çökeltiye eklenir.
- 4) Karışım vortekslenir ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
- 5) Tüpe 50 ml çizgisine kadar steril distile su eklenir.
- 6) ≥ 3000 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüj edilir.
- 7) Üst sıvı süzülür. Çökeltiye bir damla fenol kırmızısı ayırıcı çözeltisinden damlatılır ve açık pembe renk oluşana kadar %4'lük NaOH ile nötralize edilir.
- 8) Kültür besiyerine ekilir. Çökeltiden yayma hazırlanır ve boyanarak mikroskopta incelenir (Metchock et al., 1999; Saniç ve Çoban., 1999).

2.4.3.7. Oksalik Asit Yöntemi

Oksalik asit (ethanedioic asit, $C_2H_2O_4$), klinik örneklerin sürekli *Pseudomonas* türleri ile kontamine olduğu durumlarda kullanılır. Oksalik asitin, diğer organik asitlere göre (sülfürik asit, asetik asit) dekontaminasyon yöntemlerinde tercih edilmesinin sebebi, oksalik asitin tüberküloz basillerini öldürücü etkisinin daha az

olmasıdır. Klinik örnekler bu yöntemle işlenildiği zaman Bactec kültür tüplerine de ekimler yapılabilir (Metchock et al., 1999; Isenberg., 1992).

Çözeltilerin hazırlanması

%5 oksalik asit:

5 g oksalik asit 100 ml distile suda çözülür ve otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edilir. Çözelti oda sıcaklığında saklanır.

% 4'lük NaOH

4 g NaOH 100 ml distile suda çözülür ve otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edilir. Çözelti oda sıcaklığında saklanır.

% 0,85 NaCl:

0,85 g NaCl 100 ml distile suda çözülür ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Fenol kırmızısı ayıracı çözeltisi

20 ml % 4'lük NaOH içinde 8 mg fenol kırmızısı tozu çözülür ve steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır (Saniç ve Çoban., 1999).

Uygulama

- 1) 50 ml'lik konik polipropilen vidalı kapaklı santrifüj tüpüne klinik örnek en fazla 10 ml olacak şekilde konulur ve üzerine eşit miktarda %5'lik oksalik asit eklenir.
- 2) 30 saniye vortekslenir ve 30 dakika ara sıra çalkalanarak oda sıcaklığında (20-25°C) bekletilir.
- 3) Santrifüj tüpüne 50 ml çizgisine kadar %0,85 NaCl eklenir ve birkaç kere içerik alt üst edilerek karıştırılır.
- 4) ≥ 3000 devir/dakika hızla 15-20 dakika santrifüj edilir.
- 5) Üst sıvı süzülür, uygun dezenfektan içeren kaba atılır.
- 6) Birkaç damla fenol kırmızısı ayıracı çözeltisi çökeltiye eklenir. Açık pembe renk oluşana kadar %4'lük NaOH ile pH nötralize edilir. Çökeltiden yayma yapılır ve uygun besiyerine ekilir (Isenberg., 1992).

2.4.3.8. Setilpiridinyum Klorid-Sodyum Klorid Yöntemi

Setilpiridinyum Klorid (CPC)-Sodyum Klorid yönteminde, taşıyıcı içinde klinik örneğin (özellikle balgamın) homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi yapılmaktadır (Saniç ve Çoban., 1999). Bu yöntemde %1 CPC - %2 NaCl çözeltisi etkin olarak örnekleri sindirir ve dekontamine eder. CPC dekontamine etme, NaCl ise sıvılaştırma amacı ile kullanılır. Bu yöntemin avantajı, klinik örneklerin işleme tabi tutulmasının geciktiği durumlarda, taşıyıcı içinde homojenizasyon-dekontaminasyon işleminin sağlanmasıdır. Dezavantajı ise bu işlemin tamamlanması için en az 24 saatin gerekmesidir (Metchock et al., 1999; Isenberg., 1992). Yapılan çalışmalara göre bu yöntem, *M. tuberculosis*'den farklı diğer mikobakteriler için daha çok sayıda kültür pozitifliği sağlamakta ve NALC-NaOH yöntemine göre daha az kontaminasyonla sonuçlanmaktadır. CPC, agarlı besiyerine ekilen mikobakteriler için bakteriyostatik olduğundan, bu yöntem ile muamele edilen örneklerin çöktelleri yalnızca yumurtalı besiyerine (Löwenstein Jensen vb.) ekilmelidir (Saniç ve Çoban., 1999).

Çözeltilerin hazırlanması

Setilpiridinyum Klorid-Sodyum Klorid

1000 ml steril distile suda 20 g NaCl ve 10 g CPC çözülür. Bu çözelti sterildir ve buharlaşmadan, yüksek sıcaklıktan ve ışıktan korunursa uzun süre bozulmadan kalabilir. Çalışma sırasında hafif ısıtılarak kristaller çözülebilir.

%0,85 NaCl

NaCl 0,85 g

Distile Su 100 ml

NaCl, distile su içinde çözülür ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

% 0,2 sığır albümin fraksiyon V çözeltisi

Stok %2 sığır abümin çözeltisi:

NaCl 0,85 g.

Sığır albümin fraksiyon V 2 g.

Distile su 100 ml.

100 ml distile suda 0,85 g NaCl çözülür ve üzerine 2 g sığır albümin fraksiyon V yavaş yavaş eklenir ve iyice karıştırılır (karıştırma işlemlerinde çalkalamaktan kaçınılmalıdır). %4 NaOH ile pH 6,8'e ayarlanır. 0,45 mm por çaplı membran fitrelerden geçirilerek sterilize edilir.

%0,2 çalışma çözeltisi hazırlamak için;

Stok %2 sığır albümin çözeltisi 1 birim

Steril %0,85 NaCl çözeltisi 9 birim

olacak şekilde 1:10 oranında karıştırılarak %0,2'lik sığır albümin fraksiyon V çözeltisi hazırlanır.

Uygulama

- 1) 50 ml'lik burgu kapaklı santrifüj tüplerine 10 ml veya daha az balgam toplanır.
- 2) Eşit miktarda CPC – NaCl eklenir, kapak sıkıca kapatılır, örnek sıvılaşıncaya kadar el ile çalkalanır.
- 3) Örnekler taşıma tüplerinde laboratuvara gönderilir. Örnekler taşıma sırasında dekontamine olurlar (en az 24 saat homojenizasyon- dekontaminasyon işleminin tamamlanması için bekletilmelidir).
- 4) Örneğin üzerine tüpün 50 ml çizgisine kadar steril distile su ilave edilir. Birkaç kere karışım ters düz edilir.
- 5) ≥ 3000 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüj edilir.
- 6) Üst sıvı, uygun dezenfektan içeren kaba atılır. Çökeltiye 1-2 ml steril distile su, %0,85'lik NaCl veya %0,2 sığır albümin fraksiyon V çözeltilerinden biri eklenerek çökelti süspanse edilir.
- 7) Süspanse edilen çökelti, yumurta bazlı besiyerine ekilir ve çökeltiden yayma yapılır, boyanır ve incelenir (Metchock et al., 1999; Saniç ve Çoban., 1999).

Sayılan tüm homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri içerisinde günümüzde en yaygın kullanılanı NALC-NaOH yöntemidir.

Tablo 2.4'te homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri arasındaki kullanım amaç ve farkları verilmiştir.

Tablo 2.4. Homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri (Saniç ve Çoban., 1999).

NALC-NaOH Yöntemi	NALC mukolitik etken olarak kullanılır (%2,5). Dekontaminant olarak ise NaOH kullanılır.
%4'lük NaOH	Geleneksel dekontaminasyon çözeltisidir. Örneği dekontamine etme süresine dikkat edilmelidir (15 dakikayı geçmemelidir).
%5'lik oksalik asit	Sürekli <i>P.aeruginosa</i> ile oluşan kontaminasyonların önlenmesinde kullanılır.
Sülfürik asit yöntemi	Alkali sindirici kullanıldıktan sonra, idrar veya diğer vücut sıvılarının sürekli kontaminasyonlarında bazen yardımcı olabilir.
Setilpiridinyum klorid – sodyum klorid yöntemi	Bu yöntem ile taşıyıcı içinde balgamın dekontaminasyonu yapılmaktadır. Klinik örnek laboratuvara ulaştığında dekontaminasyon işlemi tamamlanmıştır. Tüberküloz basili taşıyıcı içinde 8 gün canlılığını koruyabilir.
Zefiran trisodyum fosfat (Z – TSP) yöntemi	Zefiran mikobakterilere karşı bakteriyostatiktir. Santrifüj sonrası elde edilen çökelti besiyerine ekilmeden önce fosfat tamponu ve su ile nötralize edilmelidir. Zefiran lesitin ile nötralize olur. Yumurtalı besiyerine ekim yapılmayacaksa lesitin ile nötralize edilmelidir.

Kültür için klinik örneklerin, ekim öncesi hazırlıkları ve uygulanacak homojenizasyon- dekontaminasyon yöntemleri;

Açlık Mide Sıvısı: Örnek alındıktan sonra 4 saat içerisinde işleme sokulmalıdır. Midenin asidik içeriği, tüberküloz basiline zarar verebileceğinden, midenin asidik içeriğini nötralize etmek için 5-10 ml açlık mide sıvısına 100 mg sodyum karbonat eklenir. İşleme tabi tutulmadan önce mukuslu kısımlar alınır ve balgam için önerilen dekontaminasyon basamakları uygulanır (WHO/TB/98.258., 1998; Saniç ve Çoban., 1999).

İdrar: Örnek alındıktan sonra, sülfürik asit dekontaminasyon yöntemi uygulanabilir ve uygun besiyerine ekilir veya santrifüj tüpüne alınan idrar 3000 devir/dakika hızda 30 dakika santrifüj edilir. Üsteki idrar atılır. Çökeltiyeye 2ml %5-

6'lık HCl eklenip, 20-40 dakika bekletilir. Bu süre sonunda fenol kırmızısı ayıraç çözeltisinden bir damla damlatılır ve sonra %2-4 NaOH çözeltisinden damla damla damlatılarak pH nötral hale getirilir. 3000 devir/dakika hızda 30 dakika çevrilir ve üst sıvı dökülerek çökeltiden yayma hazırlanarak, kültüre ekilir (Bilgehan., 2002; Saniç ve Çoban., 1999)

Laringeal eküvyon: Steril bir santrifüj tüpüne, steril pens yardımı ile eküvyon konulur. Eğer gerekli ise eküvyon kırılır ve böylece tüpe konulabilir. Üzerine 2 ml steril distile su veya serum fizyolojik eklenir. Bunun da üzerine 2 ml NALC - NaOH eklenir. Test tüpü bir karıştırıcıda karıştırılır ve sonra 15 dakika dik tutulur. Santrifüj edilecek tüpten eküvyon alınır, tüpün üzeri steril su veya fosfat tampon çözeltisi ile doldurulup balgam için uygulanan işlemdeki basamakları içeren yöntem ile devam edilir (Saniç ve Çoban., 1999).

Doku: Lenf nodları, biyopsiler ve diğer cerrahi doku parçaları, steril bistüri veya makasla kesilerek küçük parçalara ayrılmalıdır. İncelenen doku bir homojenizatör ile öğütülür ve %2'lik sığır albümin veya %0,85'lik serum fizyolojik içine konur. Şayet doku mukus içeriyorsa bir miktar NALC ilave edilir. Eğer doku steril olarak toplanmış ise; etkenin çoğalmasını kolaylaştırmak için sıvı bir kültür ortamına (Middlebrook 7H9) doğrudan ekim yapılır. Steriliteye dikkat ederek sıvı kültürden haftalık yayma hazırlanır ve boyanarak aside derinçli basil yönünden incelenir. Eğer basil var ise, sıvı besiyeri 3000 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüj edilir ve tüpün dibinden 1 ml alınıp katı besiyerine ekilir. 4-8 hafta 35-37°C'de inkübe edilir (Eğer klinik örnek yüzeysel dokulardan alınmış ise 30-32°C' de inkübe edilir). Eğer doku steril olarak toplanmamış veya bu konuda bir kuşku var ise; klinik örneğin bir parçası sıvı ortama doğrudan ekilirken, kalan örnek balgam örneklerine uygulanan yöntemlerden, uygun olanın seçilip işleme sokulmasıyla hazırlanır (Saniç ve Çoban., 1999).

Cerahat, irin: Örnek çok yoğun ise, aynı balgam gibi dekontamine edilir (WHO/TB/98.258., 1998).

Beyin Omurilik Sıvısı: Steril şartlarda alınmış BOS; 2000 devirde 20 dakika santrifüjle çevrilip, çökeltiden ekim yapılır (Bilgehan., 2002). Eğer BOS'ta

kontaminasyon varsa, çökeltiyeye %4 sülfürik asit'ten 2 ml eklenir ve 15 dakika beklenir. Sonra 15 ml steril serum fizyolojik eklenir ve 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilir ve sediment kültüre ekilir (WHO/TB/98.258., 1998).

Diğer vücut sıvıları (plevral sıvılar dahil): Müköpürülen sıvının hacmi 10 ml veya daha az ise balgam örneklerindeki gibi işlenir.

Eğer berrak sıvılar aseptik şartlarda alınmış ise ≥ 3000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilir ve çökelti doğrudan kültür besiyerine ekilir. Spinal, sinoviyal ve diğer vücut içi sıvıları, kemik iliği, soğuk abse, cerrahi örnekler (otopsi örnekleri hariç), plevral sıvılar, lenf nodu ve biyopsi örnekleri (eğer fistülsüz ise) aseptik şartlarda alınmış ve steril taşıyıcı kaplarda biriktirilmiş ise, dekontamine edilmeden kültür besiyerine ekilir. Örneklerin kontamine olduğu kuşkusu varsa, örneğin bir kısmı seçici olmayan kültür besiyerine ekilir. 24 saat inkübe edilir. Böylece mikobakteriler dışındaki hızlı büyüyen organizmaların varlığı kontrol edilir. Eğer kontaminant mikroorganizma varlığı saptanırsa, klinik örnek dekontamine edilir (WHO/TB/98.258., 1998).

2.4.4. Geleneksel Kültür Yöntemleri

Tüberküloz hastalığının tanısı, epidemiyolojik açıdan değerlendirilmesi ve tedavisinin yönlendirilmesi için öncelikle hastalık etkeni olan mikobakterinin klinik örnekten izole edilmesi gerekir. Yani mikobakteri içerdiğinden şüphe edilen tüm klinik örneklerin kültürü yapılmalıdır. Ayrıca kültür ile çoğaltılan izolatların daha sonraki araştırmalar için saklanabilmeleri de sağlanmalıdır. Kültür, mikroskopla incelemeye göre oldukça duyarlı olup, klinik örneğin mililitresinde 10-100 arasında basil bulunması kültür pozitifliği için yeterlidir. Kültür ile aynı zamanda mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması, antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının saptanması ve epidemiyolojik açıdan inceleme yapılması sağlanabilmektedir. Bundan dolayı kültür, tüberkülozun tanısında halen *altın standart yöntem* olmaya devam etmektedir (Baylan., 2004; Özakin., 2002).

Mikobakterilerin izolasyonu için ideal besiyeri ortamı; az sayıdaki mikobakterilerin hızlı ve bol gelişimini sağlamalı, pigment oluşumu ve koloni

morfolojisinin temelinde izolatların farklılaşmasına izin vermeli, kontaminasyon gelişimini inhibe etmeli, besiyerinde var olan maddeler kolayca hazırlanabilmeli, ekonomik olmalı ve ilaç duyarlılık testleri yapılabilmelidir (Saniç ve Çoban., 1999).

Mikobakterilerin izole edilmelerinde ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan geleneksel besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir.

Sıvı besiyerleri arasında yer alan Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albümin, mikobakterilerin stok suşlarının pasajlarının yapılması, duyarlılık deneyleri ve diğer in vitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla kullanılır. Ayrıca bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakteriyi çoğaltmak ve dolayısıyla izolasyon şansını arttırmak amacıyla da kullanılabilir. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri, çoğu hızlı kültür sisteminde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır (Uzun., 2003).

Katı besiyerlerinde ise kültür işlemleri zahmetlidir. Çünkü koloniler gözle görülebilir hale gelinceye kadar birkaç hafta geçmesi gerekmekte olup, üreyen mikobakterinin türünü saptamak için pasaj yapılması da gerekmektedir. Bu olumsuz özelliklere karşın katı besiyerleri, bazen sıvı besiyerlerinde üremeyen suşların üretilmesinde ve karışık mikobakteriyel enfeksiyonların saptanmasında yardımcı olurlar. Eğer sıvı kültürler kontamine olmuş ise bunları desteklemek için görev alabilirler. Katı besiyerleri, yumurta ve agar bazlı besiyerleri olmak üzere iki çeşittir (Baylan., 2004).

Yumurta bazlı besiyerleri; yumurta sarısı veya bütün yumurta, patates unu, tuz, gliserol gibi maddeleri içerirler. Besiyerlerinin görünümü opaktır. Bu besiyerlerinin avantajları; +4°C' de saklandıkları zaman bir kaç ay kullanılabilmeleri, bir çok mikobakteri türünü etkin olarak üretebilmeleri ve tipik koloni morfolojisini göstermeleri, besiyerinin içeriğinde bulunan fosfolipitler sayesinde besiyeri veya ekimi yapılan örnek içindeki toksik maddeleri bağlayarak etkisiz hale getirmeleri, malaşit yeşili ile kontaminant mikroorganizmaların üremelerini engellemeleri, ucuz ve güvenilir olmalarıdır. Yumurta bazlı besiyerlerinde kolonilerin görünür hale geliş 18-24 günü bulmaktadır. Koloni oluşumunun erken dönemde saptanması ve artık maddelerle kolonileri birbirinden ayırmadaki zorluk, ilacın besiyerine dengeli

konsantrasyonlarda dağılmaması nedeniyle antimikobakteriyel duyarlılık testlerinde standardizasyon sıkıntısı yumurta bazlı besiyerlerinin dezavantajıdır (Metchock et al., 1999, Einsenstadt et al., 1995; Della-Latta and Weitzman., 1998). Yumurta bazlı besiyerleri içinde en yaygın kullanılanı Löwenstein Jensen besiyeridir. Ayrıca bu grupta Petragnani ve American Trudeau Society gibi besiyerleri de bulunmaktadır. Löwenstein Jensen besiyeri, *M. tuberculosis*'in tanısında iyi iken, diğer türlerin izolasyonunda güvenilir değildir. Mikobakterilerin tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri sebebiyle özellikle primer izolasyonda Löwenstein Jensen besiyerinin kullanılması önerilmektedir. Petragnani besiyeri Löwenstein Jensen besiyerinden iki kat fazla malaşit yeşili içerdiğinden, yoğun kontaminasyonlu klinik örneklerden mikobakterilerin izole edilmesinde Löwenstein Jensen besiyerinden daha iyi sonuçlar vermektedir. American Trudeau Society besiyerinin malaşit yeşili içeriği Löwenstein Jensen besiyerinden daha düşük miktarda olduğundan, kontamine olmayan veya az kontamine olduğu düşünülen örneklerin kültüründe kullanılır (Metchock et al., 1999; Della-Latta and Weitzman., 1998; Einsenstadt et al., 1995; Uzun., 2003).

Agar bazlı besiyerlerinden en çok tercih edileni, Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11'dir. Kimyasal içerikleri, yumurta bazlı besiyerlerinden daha iyi bilinmektedir. Bu besiyerleri çeşitli tuzlar, vitaminler, kofaktörler, malaşit yeşili, gliserol ve agardan oluşup oleik asit, glikoz, sığır albümini, katalaz ile zenginleştirilmişlerdir. Middlebrook 7H11'in 7H10'dan farkı, %0,1 enzimatik kazein hidrolizati içermesidir. Besiyerlerinin görünümü şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerlerinde koloniler 10-12 gün sonra mikroskop altında görülebilecek boyutlara ulaşırlar. Bu besiyerleri, mikobakterilerin üreme sürelerini kısaltmak amacıyla kullanılırlar. Agar bazlı besiyerleri ilaç duyarlılıklarının saptanması amacıyla da kullanılmaktadır. Bu besiyerlerinin dezavantajı, pahalı olmaları ve raf ömürlerinin nispeten yumurta bazlı besiyerlerine göre kısa olmasıdır (buzdolabında 1 ay). Besiyerlerinin ısı ve ışığa maruz kalması üretici özelliklerini bozmakta olduğundan, depolama şartlarına dikkat edilmelidir (Uzun., 2003; Metchock et al., 1999; Della-Latta and Weitzman., 1998; Eisenstadt et al., 1995)

Seçici besiyerleri; Löwenstein Jensen, Middlebrook 7H10 ve 7H11 besiyerlerine antimikrobiyal maddeler eklenerek, kontaminasyona neden olan

mirkoorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla hazırlanır. Bu besiyerleri; penisilin ve nalidiksik asit içeren Löwenstein-Jensen-Gruft, sikloheksimid, linkomisin ve nalidiksik asit içeren Mycobactosel Löwenstein Jensen, karbenisilin, polimiksin B, trimetoprim laktat ve amfoterisin B içeren Mitchison selektif 7H11 ve sikloheksimid, linkomisin, nalidiksik asit içeren Middlebrook 7H10 besiyerleridir. Primer izolasyonda besiyerlerinden en az birisinin selektif olması önerilmektedir (Metchock et al., 1999; Uzun., 2002)

Günümüzde birçok laboratuvarında, geleneksel besiyerlerinin yanısıra tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri günlük inceleme amacıyla kullanılmaktadır. Çoğunda sıvı besiyeri kullanılmakla birlikte, bifazik ve katı besiyerlerinin kullanıldığı sistemlerde bulunmaktadır. Mikobakterilerin üreme şansını arttırmak için bu sistemlerde kullanılan besiyerlerinin içerikleri oldukça zengindir (Uzun., 2003).

Hızlı kültür sistemleri cihaz ve bilgisayar ile değerlendirilip değerlendirilmemesine göre gözle izlenebilen veya otomatize sistemler olarak gruplandırılabilirken, kullanılan üreme ayıraçlarına göre sistemleri; radyometrik floresan, kolorimetrik olarak gruplandırabilmek de mümkündür. Bilgisayar destekli ve süregen değerlendirme yapan gelişmiş otomatize kültür sistemlerinde üremenin saptanması bireysel değerlendirmeden uzaklaştırılarak, bilgisayar sistemleri ile daha standart ve objektif hale getirilmiştir. Hızlı kültür sistemlerinin çoğunda, mikobakterilerin izolasyonunun yanısıra, tür düzeyinde tanımlanmaları ve primer tüberküloz ilaçlarına karşı olan duyarlılıkları da saptanabilmektedir.

Dünya sağlık örgütü, mikobakterilerin izolasyonu amacıyla sıvı ve katı özellikte iki ayrı tüberküloz besiyerinin beraber kullanılmasını önermektedir. Bu uygulama ile mikobakteri izolasyon oranlarını arttırmak hedeflenmektedir (Özakın., 2002).

Kültür besiyerlerine ekim aseptik koşullarda yapılmalıdır. Örnekten pastör pipeti ile 3-4 damla alınarak tüplerdeki yatık veya plak besiyerlerinin yüzeylerine damlatılarak, kolonilerin oluşması için besiyerleri uygun biçimde eğdirilip doğrultmak suretiyle dağıtılarak ekim yapılır. Ekim yapılan tüplerdeki besiyerleri bir

gün yatık halde bırakılır. Daha sonra kurumaması için ağızları lastik kapşon veya parafinle kapatılıp dik olarak, plak besiyerleri ise bir kaç bir arada plastik torbalara yerleştirilerek 37°C’de inkübe edilirler. Kültürlerin 4-10 gün süre ile %5-10 CO₂’li ortamda bulundurulmasının üremeyi hızlandırıcı etkisi vardır (Bilgehan., 2002).

Çabuk üreyen mikobakterileri saptamak veya kontaminasyon olup olmadığını anlamak için 2. ve 4. günlerde besiyerleri kontrol edilir. Üreme varsa EZN ile boyanıp, incelenir. Kontaminasyona karar verilirse tekrar örnek alınıp, işlemler yeniden tekrarlanır. Başlangıçta, küçük kolonileri görebilmek için agarlı besiyerleri arkadan, yumurtalı besiyerleri ise yatık kısımdan küçük büyütme objektif kullanılarak mikroskopta incelenir. Her hafta kontrol edilen kültürlerde 6-8 hafta sonunda üreme olmamış ise besiyeri yüzeyinden sürüntü alınıp, preparat hazırlanır ve ARB aranır. ARB saptanmamış ise sonuç “Üreme olmadı” şeklinde rapor edilir (Kıyan., 1999). Üreme olduğunda koloniler, büyüklük, görünüm ve pigment bakımından incelenerek boyanma özellikleri araştırılır. Tür saptama için gerekli incelemeler tamamlanır (Bilgehan., 2002). *M. tuberculosis*, Löwenstein Jensen besiyerinde ikinci- üçüncü haftalarda kabarık, pürüklü, düzensiz kenarlı, deve tüyü renginde, sarımsı beyaz koloniler oluşturur.

Löwenstein Jensen besiyerinde *Mycobacterium tuberculosis* kolonilerinin görünümü Şekil 2.3 ve Şekil 2.4’te verilmiştir.



Şekil 2.3. Löwenstein Jensen besiyerinde *Mycobacterium tuberculosis* kolonilerinin uzaktan görünümü (<http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler>., 2005)



Şekil 2.4. Löwenstein-Jensen besiyerinde *Mycobacterium tuberculosis* kolonilerinin yakından görünümü (<http://www.textbook of bacteriology.net/tuberculosis.html>, 2005)

Kültür pozitifliği koloni sayısına göre yarı-kantitatif olarak ifade edilir ve Tablo 2.5’te belirtildiği gibi rapor edilir (Kıyan., 1999).

Tablo 2.5. Kültür pozitifliğinin değerlendirilmesi (Kıyan., 1999).

Koloni Sayısı	Değerlendirme
50 koloniden az üremede	Koloni sayısı bildirilir
50-100 koloni	(+)
100-200 koloni	(++)
200-500 koloni	(+++)
500 koloniden daha fazla koloni	(++++)

2.4.5. Kültür Yapılmadan Basil Saptanması

Mikroskopla inceleme ve kültür gibi klasik tanı yöntemleri, mikobakterilere bağlı enfeksiyonların tanısında önemini eskisi gibi korumaktadır. Fakat bu yöntemler oldukça uzun zaman almakta ve yeni etkenlerin tanımlanmasında yetersiz kalabilmektedir. Moleküler yöntemler oldukça hızlı olmaları ve tanımlama aralıklarının genişliği nedeniyle mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında da yaygın

kullanım alanı bulmuştur. Mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin amacı;

- Mikobakterilerin klinik örneklerde varlığının saptanması,
- Klinik örneklerde bulunan veya kültürde üretilen bakterilerin türlerinin saptanması veya tiplendirilmesi,
- Mikobakterilerin ilaçlara dirençli olup olmadıklarının araştırılması,
- Moleküler epidemiyolojik araştırmalar ile mikobakteri enfeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkartılmasıdır (Saniç ve Eroğlu., 2003).

Yayma pozitif olgularda moleküler yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü %95'ten fazladır. Moleküler yöntemlerin pahalı olması, özel laboratuvar donanımı gerektirmesi ve yayma negatif olgularda duyarlılığın daha düşük (%50-70) olması diğer alternatif yöntemler üzerindeki araştırmaların da sürdürülmesine yol açmıştır (Sürücüoğlu., 2004).

Tüberküloz tanısında serolojik testlerin kullanılmasına uzun zaman önce başlanılmış olmasına rağmen, bu testler günlük uygulamalarda yer alabilecek etkinliği göstermemiştir.

Seroloji, özellikle klinik ve radyolojik tüberküloz bulguları olmayan hastaların hızlı tanısını sağlar. Radyolojik bulgular doku hasarından sonra ortaya çıkarken, hastalığın başında üretilen antikorlar serolojik olarak erken tanı koydurabilir. Ayrıca, çocuklarda, serumun elde edilmesi balgamdan daha kolay olduğu için tercih edilmektedir. Seroloji, akciğer dışı tüberküloz tanısına da yardımcıdır. BCG ile aşılananlarda gelişen hücresel yanıtın etkilenmemesi de önemli bir avantajdır. Bu testlerin dezavantajları; yüksek enfeksiyon hızı olan ülkelerdeki hastalarda, AIDS'li ve yayma negatif hastalarda duyarlılığının düşük olmasıdır. Ayrıca, pahalı, deneyimli personel gerektiren ve *M. tuberculosis* ile tüberküloz dışı mikobakterileri her zaman birbirinden ayırt ettiremeyen testlerdir. Serolojik testlerin çoğu, tarama amacı ile kullanılabilecek yararlı testlerdir (Özerol., 2003).

2.5. Epidemiyoloji ve Korunma

Dünya genelinde tüberküloz hastalığı artmaktadır. Dünya nüfusunun üçte birisinin yani yaklaşık 2 milyar kişinin tüberküloz basili ile enfekte olduğu ve yılda yaklaşık 2 milyon insanın tüberküloz hastalığından öldüğü tahmin edilmektedir. Damlacık yoluyla bulaşma kolaylığı nedeniyle, kalabalık yaşam şartlarında olanlar ve doğal direnci düşük olan toplumlar, tüberkülozun hızlı yayılmasında en önemli iki etkindir (Bilgiç., 2003).

Tüberkülozun epidemiyolojisinin temelinde tarama ve yeni olguları ortaya çıkarma vardır. Taramanın amacı enfekte ve aktif hastalığı olan kişileri bulmaktır (Kıyan., 1999).

Son yıllarda dünyada tüberküloz insidansındaki artış şu faktörlere bağlanmıştır.

- Sağlık politikalarında tüberküloza yeterli önemin verilmeyişi:

Özellikle az ve orta gelişmiş ülkelerde tüberküloz kontrolüne yeterli ödenek ve dikkatin verilmeyişi nedeni ile iyileşme hızları %50'lerin altına düşmüştür. Bunun sonucu olarak kronikleşen ve sürekli basil saçarak toplumu enfekte eden kişi sayısı artmıştır.

- Demografik değişiklikler:

Son 30 yılda çocuk ölümlerindeki azalma sonucu genç erişkin nüfus sayısındaki artış nedeni ile, çocuklukta tüberküloz basili ile enfekte olmuş ve dolayısıyla %10 oranında hastalanma şansı olan kişi sayısında artış meydana gelmiştir.

- HIV epidemisi:

HIV, özellikle Asya ve Afrika'da tüberkülozda durumun kötüleşmesine önemli katkıda bulunmuştur. HIV ile enfekte kişilerde tüberküloz basilini taşıyorsa

hastalanma şansları yılda %5-10 gibi çok yüksek değerlere çıkmaktadır. Bu da genç ve orta yaş erişkinlerde tüberküloz hastalığı ve buna bağlı ölümleri arttırmaktadır.

- Sosyo-ekonomik koşullarda kötüleşme:

Son 10 yıl içinde en az gelişmiş kabul edilen ülke sayısı iki katına çıkmıştır. Bu da tüberküloz kontrolüne ayrılan kaynakların kısıtlanmasına yol açmıştır. Çeşitli nedenlerle göçlerin artışı da tüberkülozun yayılmasında önemli bir etken haline gelmiştir.

Bütün bu gelişmelerin sonucunda dünya yirmibirinci yüzyılda eskiden olduğundan daha ciddi tüberküloz sorunu ile karşı karşıya gelmiştir ve balgam yayması (+) olgu sayısı artmıştır. Çok önemli tüberküloz ilaçları olan INH veya Rifampisine veya her ikisine karşı direnç önemli oranlara ulaşmıştır. Tedavi edilemeyen olgular ilaçlara duyarlı basiller ile başka kişilerin enfekte olmalarına neden olup sonra da ölmekte iken, yetersiz tedavi edilen olgular uzun süre yaşamakta, fakat kronikleşip dirençli basille çok sayıda kişiyi enfekte etmektedirler (Kılıçaslan., 2002).

Türkiye’de veremle savaş Prof. Dr. Besim Ömer Paşa tarafından 1918 yılında başlatılmıştır. Geniş çaplı kitle taraması ve aşı çalışmaları 1953-1956 yılları arasında yapılmış ve bu dönemde taranan kişilerin %56’sının tüberküloz basilleri ile enfekte olduğu belirlenmiştir. Aynı oran 1980’li yıllarda %36’ya düşmüştür. Mortalite oranı 1945 yılında yüzbinde 262; 1960 yılında yüzbinde 55 ve 1982 yılında yüzbinde 8 olarak belirlenmiştir. 1950’li yıllardaki ölüm nedenleri arasında ilk sırayı alan tüberküloz, günümüzde dokuzuncu sırada yer almaktadır.

Tüberkülozda koruma çalışmalarında iki temel yaklaşım bulunmaktadır;

1) Birincil koruma: henüz tüberküloz basili ile karşılaşmamış kişilerde, tüberküloz gelişimini önlemek amacıyla uygulanır. Bunun için iki yöntem uygulanmaktadır.

a) Tüberkülozlu hastaların özellikle de akciğer tüberkülozlu hastaların erken dönemde belirlenerek, etkin bir şekilde tedavi edilmesiyle kaynak olguların sayısının

azaltılıp bu şekilde enfekte olmamış kişilerin tüberküloz basili ile karşılaşma riskinin azaltılması,

b) BCG ile aşılama; hastalık yapma gücünü kaybetmiş fakat, canlılığını koruyan bir *M.bovis* suşu ile hazırlanmış aşırı uygulayarak henüz enfekte olmamış kişide tüberküloz basiline karşı koruyucu bağışıklık oluşturulmasıyla, bu kişinin tüberküloz basili ile karşılaşması durumunda enfeksiyon ve hastalık gelişiminin önlenmesine yardımcı olunmasıdır (Kıyan., 1999).

BCG aşısı, çocukluk dönemindeki miliyer ve menenjit gibi ciddi tüberküloz şekillerinden koruyucu olduğundan, ülkemizde BCG aşısı genişletilmiş bağışıklama programının bir parçası olarak uygulanmaktadır.

Ülkemizde tüberküloz hastalarının temaslıları, hapisanede bulunanlar ve sağlık çalışanlarının risk grubu oluşturduğunu gösterir araştırmalar bulunmaktadır. Yurtdışında evsizler, bakım evlerinde, huzur evlerinde, alkol-ilaç bağımlılığı tedavi merkezlerinde yaşayanlar, damardan uyuşturucu kullananların risk grubu oluşturdukları gösterilmiştir.

Risk gruplarında tarama yapma görevi, ülkemizde Verem Savaş Dispanserlerindedir. Ücretsiz yürütülür. Risk grubu olarak kabul edilen topluluklarda aktif tarama yapılması gereklidir. Tarama ve tüberküloz hastalığı tanısı konulanlar tedaviye alınır.

Tüberküloz hastalarının izlendiği kurumlarda bulaşmanın önlenmesi için gerekli önlemler alınmalıdır. Yöntemle ilgili önlemler, mühendislik önlemleri ve maske kullanımı gereklidir. Kurumlarda bulaşmanın önlenmesi için alınan, önlemlerin etkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle tüberküloz hastalarına sık tanı konulan hastaneler, dispanserler ve diğer kurumlarda bulaşmayı önleyici uygulamaların yapılması önemlidir (Bilgiç., 2003).

2) İkincil koruma: Enfekte olan kişilerde hastalık gelişmesinin önlenmesi amacıyla, genellikle INH verilerek enfeksiyonun klinik hastalığa dönüşmesinin engellenmesi sağlanır. Hasta olmayanlardan, tüberkülin cilt testi konversiyonu saptananlara, sekel

lezyonu olanlara, 35 yaş altı temaslıların, tüberkölün deri testi pozitif 5 yaş altındaki çocukların koruyucu tedavi almaları gereklidir. Koruyucu tedavi ile enfekte kişilerin %60-90 oranında hastalanmaları önlenmektedir. 6-9 ay süreyle verilen INH ile hastalıktan koruyucu etkinin 19 yıla kadar sürdüğü bilinmektedir (Kıyan., 1999; Bilgiç., 2003).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

187 balgam, 2 idrar, 1 transbronşiyal aspirat, 9 bronkoalveolar lavaj (BAL) ve 1 açlık mide sıvısından oluşan toplam 200 örnekten yapılan bu çalışma, İstanbul Süreyyapaşa Güğüs Kalp ve Damar Hastlıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Bakterioloji Laboratuvarında yürütüldü.

3.1. Araç - Gereçler

3.1.1. Kullanılan Besiyeri, Kimyasallar ve Kitler

- a) Löwenstein-Jensen kültür besiyeri (Salubris A.Ş.),
- b) Steril 500 ml'lik distile Su (Eczacıbaşı A.Ş.),
- c) NaOH (Sigma, Germany),
- d) HCl (Sigma, Germany),
- e) Brom-timol mavisi (Merck, Germany),
- f) Bazik fuksin (toz) (Panreac, Spain),
- g) Fenol (Atabay A.Ş.),
- h) Metilen mavisi (toz) (Merck, Germany),
- ı) İmersiyon yağı (Merck, Germany),
- i) Mycoprosafe kiti (Salubris A.Ş.),
- j) Distile su,
- k) % 90-95' lik Etil alkol,
- l) Dezenfektan çözelti.

3.1.2. Araçlar

- a) Otomatik pipetler (1000µl'lik),
- b) Santrifüj (rotor yarıçapı 20 cm) (Hermle Z 400),
- c) Santrifüj,
- d) pH – metre (Lutron – YK – 21, Taiwan),
- e) Vorteks,
- f) Işık mikroskobu (Olympus)

- g) Etüv
- h) Hassas Terazî
- ı) Otoklav
- i) Buzdolabı

3.1.3. Cam ve Diğer Malzemeler

- a) Steril kapaklı 10 ml’lik (1,5 cm çaplı) polietilen tüp,
- b) Steril cam balon (1000 ml, 500 ml, 100 ml),
- c) Steril beher (100 ml, 500 ml, 1000 ml),
- d) Steril plastik pipet uçları,
- e) Damlalık (plastik),
- f) Enjektör,
- g) İğne ve halka öze,
- h) Atık kabı,
- ı) Eldiven ve maske,
- i) Steril gazlı bez,
- j) Bölmeli sepet.

3.2. Örneklerin Toplanması ve Yöntem

Laboratuvara gönderilen hastalara, idrar örneğinin temizlik yapıldıktan sonra, sabah ilk idrarı, steril kaplara alarak laboratuvara ulaştırmaları, balgam örneğinin ise sabah ağız temizliği yapıldıktan sonra öksürülerek çıkartılan balgam olması ve steril kaplarda laboratuvara getirmeleri bildirildi. Açlık mide sıvısı bekletilmeden çalışmaya alındı. Diğer örnekler ya enjektörde ya da steril kapaklı cam veya polietilen tüplerde laboratuvara ulaştırıldı.

Toplanan bu örnekler doğrudan yayılıp EZN boyama yapılarak mikroskopta incelendi. Gelen klinik örneğin yarısı Modifiye Petroff yöntemi ile diğer yarısı da NaOH + N – Asetil L – Sistein (NaOH – NALC) yöntemi temel alınarak hazırlanmış Mycoprosafe kiti (Salubris A.Ş) ile homojenize ve dekontamine edilerek işlendi. Her iki yöntemle işlenmiş örneklerin, pH’ ları ölçüldü ve kaydedildi. İşlenmiş

örneklerden preparat hazırlandı ve EZN boyama yöntemiyle boyandı. Her iki yöntemle işlenmiş örnekler steril pipet uçları kullanılarak, otomatik pipet ile ikişer adet Löwenstein Jensen (Salubris A.Ş) besiyerine 300'er µl inoküle edildi. 24 saat 37 °C' de etüvde yatık pozisyonda bekletildikten sonra, dikey pozisyona alınarak, 37° C' de 50 gün boyunca izlendi. Her iki grubun kültürlerinde kültür kontaminasyonu olanlar saptandı. Üreme görülen tüplerdeki kolonilerden EZN boyama yapıldıktan sonra kolonilerin sayısı ve kolonilerin ilk görüldüğü gün not edildi. Buna göre üreme süresi hesaplandı ve not edildi. 50 gün boyunca üreme görülmeyen tüplerden preparat yapılarak, EZN boyama yöntemi uygulandı. Mikroskopta incelendi ve sonuçlar not edildi.

3.3. Ziehl – Neelsen (EZN) Boyama Yöntemi

3.3.1. Kullanılan Boya Eriyikleri ve Renksizleştirme İşleminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Karbol Fuksin: 3 g bazik fuksin, %90-95'lik 10 ml etanolde çözünerek, üzerine 90 ml'lik %5'lik fenol çözeltisi eklendi (%5'lik fenol: 100 ml distile suda, 5 g fenol kristalleri çözüldü).

%3'lük Hidroklorik asit (HCl) – Alkol çözeltisi:

Konsantre HCl: 3 ml

% 95' lik etil alkol: 97 ml

Konsantre hidroklorik asit, etil alkol içeren şişeye azar azar eklendi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Metilen Mavisi: 0,3 g metilen mavisi, 100 ml distile suda çözüldü (Koneman et al., 1997).

3.3.2. Boyama Yönteminin Uygulanması

1) Çalışmaya alınan tüm örneklerden aside dirençli boyama yöntemi için preparat hazırlandı. Bunun için; idrar gibi örnekler 3500 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüj

edildikten sonra üst sıvıları atılıp dip çökeltiden, balgam örneğinin ise partiküllü, varsa nekroze doku içeren koyu renkli bölgelerinden rodajlı lama kalın olmayacak şekilde yaymaları yapıldı ve havada kurutuldu.

2) Alevden 3 defa geçirilerek tespit edildi.

3) Yüzeylerini kaplayacak şekilde Ziehl – Neelsen Karbol Fuksin boyası döküldü. Boyanın kaynamamasına özen gösterilerek preparatlar alttan ısıtıldı.

4) Boya döküldü. Distile su ile yıkandı. Asit alkol ile renksizleştirme işlemi yapıldı, yıkandı.

5) Preparatların üzerine zıt boya olarak metilen mavisi döküldü. 30 saniye beklendi. Yıkanan preparat, kurutularak immersiyon objektifinde incelendi.

6) Mavi zeminde kırmızı basillerin görülmesi ARB pozitif olarak değerlendirildi. Preparatların değerlendirilmesinde 300 saha incelendi ve Tablo 3.1'deki ölçütlere göre değerlendirme yapıldı.

Tablo 3.1. Doğrudan boyalı preparatların EZN yöntemine göre değerlendirilmesi ve rapor edilmesi (Kıyan., 1999).

Sonuç	EZN yöntemi Aside dirençli basil sayısı/Mikroskop alanı
ARB görülmedi (-)	0
Şüpheli (Yeni örnek ile tekrar edilmeli)	1 – 2 / 300 alan
+	1 – 9 / 100 alan
++	1 – 9 / 10 alan
+++	1 – 9 / 1 alan
++++	> 9 / 1 alan

3.4. Homojenizasyon ve Dekontaminasyon Yöntemleri

Klinik örneklerin yarısı hastane laboratuvarında kullanılmakta olan Petroff'un modife edilmiş NaOH dekontaminasyon – homojenizasyon yöntemi uygulanarak işlendi. Diğer yarısı da NaOH + N – Asetil L – Sistein (NaOH + NALC) dekontaminasyon ve homojenizasyon yöntemi temel alınarak hazırlanmış bir

dekontaminasyon ve konsantrasyon kiti (Mycosrosafe – Salubris A.Ş) kullanılarak homojenize ve dekontamine edildi.

3.4.1. Modifiye Petroff NaOH Dekontaminasyon ve Homojenizasyon Yöntemi

3.4.1.1. Kullanılan Çözeltilerin İçeriği ve Hazırlanması

%4'lük NaOH: 40 g NaOH tanecikleri
1000 ml distile su

NaOH, distile suda eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

2 N HCl çözeltisi

%36- 37' lik HCl (konsantre HCl) 33 ml

Distile su 200 ml

33 ml HCl, 200 ml distile suya yavaş yavaş eklendi; otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi.

Brom-Timol Mavisi Ayırıcı Çözeltisi: 0,5 g brom-timol mavisi

125 ml %95' lik etil alkol

500 ml distile su

Çözelti iyice eriyinceye kadar karıştırıldı, renkli şişelerde ve oda sıcaklığında saklandı.

3.4.1.2. Balgam, Bronkoalveolar Lavaj (BAL), Açlık Mide Sıvısı ve Transbronşiyal Aspiratlarda Yöntemin Uygulanması

1) 10 ml'lik santrifüj tüpüne yaklaşık 2 ml örnek eklendi. Üzerine örneğin 2 – 4 katı kadar %4'lük NaOH eklendi.

2) Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

3) Üzerine 10 ml'ye tamamlanacak şekilde steril distile su eklendi.

4) 3000 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüj edildi; üst sıvı dezenfektan içeren kaba döküldü.

5) Çökeltiye bir damla brom-timol mavisi ayırıcı çözeltisinden damlatıldı. 2N HCl ve %4'lük NaOH çözeltilerinden damla damla eklendi ve her damladan sonra renk değişikliğini (açık mavi veya yeşil) gözlemek için çalkalandı ve çökeltinin pH'sı ayarlanmaya çalışıldı (Unat., 1982).

3.4.1.3. İdrar Örneklerinde Yöntemin Uygulanması

- 1) İdrar, 3000 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı dezenfektan içeren kaba atıldı. Çökeltiye, klinik örneğin 2-4 katı kadar %4'lük NaOH eklendi.
- 2) Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
- 3) Üzerine 10 ml'ye tamamlanacak şekilde steril distile su eklendi.
- 4) 3000 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüj edildi, üst sıvı dezenfektan içeren kaba döküldü.
- 5) Çökeltiye bir damla brom-timol mavisi ayırıcı çözeltisi damlatıldı. 2 N HCl ve %4'lük NaOH kullanılarak çökeltinin pH'sı ayarlanmaya çalışıldı (Unat., 1982).

3.4.2. Mycoprosafe Kiti ile Dekontaminasyon ve Konsantrasyon

Çalışmada NaOH + N – Asetil L – Sistein (NaOH + NALC) yöntemi temel alınarak hazırlanmış dekontaminasyon ve konsantrasyon kiti Mycoprosafe (Salubris A.Ş) kullanıldı.

Kit İçeriği;

- 1 adet 50 ml polipropilen tüp içerisinde yaklaşık 40 mg N-Asetil L-Sistein ve 4 mm çapında cam boncuklar,
- 1 adet 10 ml plastik tüp içerisinde %3 Sodyum Hidroksit ve %1,47 Trisodyum Sitrat .3H₂O çözeltisi,
- 1 adet 50 ml polipropilen tüp içerisinde 0,067 M fosfat tamponu çözeltisi (Na₂ HPO₄ + KH₂ PO₄ pH 6,8),
- 200 ml'lik polipropilen şişede dezenfektan çözelti (%2,5 sodyum hipo-klorit) (Her örnek tüpü için yaklaşık 10 ml kullanılır).

3.4.2.1. Balgam, Bronkoalveolar Lavaj (BAL), Açlık Mide Sıvısı ve Transbronşiyal Aspiratlarda Uygulama

- 1) Örnekler Modifiye Petroff yönteminde kullanılabilecek eşit miktarda olacak şekilde cam boncuklu tüp içine alındı.
- 2) Bu tüpe Sodyum Hidroksit – Sodyum sitrat çözeltisinden yaklaşık bire bir oranında eklendi. Tüpün kapağı sıkıca kapatıldı.
- 3) Vorteksle çalkalayarak örneğin homojenize olması sağlandı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 4) Örnek tüpünün 50 ml çizgisine gelecek şekilde fosfat tamponu çözeltisi dolduruldu (Artan fosfat tamponu çözeltisi diğer basamaklar için saklandı).
- 5) Tüpler 15 dakika 3500 devir/dakika hızla (rotor yarıçapı 20 cm olan satrifüjde) çevrildi.
- 6) Üst sıvı, dezenfektan içeren kaba, cam boncuklar dökülmeyecek şekilde dikkatlice boşaltıldı.
- 7) Artan fosfat tamponu çözeltisi, örnek tüpüne 5 ml çizgisine erişene dek eklendi. Cam boncuklar arasında kalan çökelti vorteksle çalkalanarak yeniden süspansiyon haline getirildi.

3.4.2.2. İdrar Örneklerinde Uygulama

- 1) İdrar örneği toplama kabından cam boncuklu tüp içerisine aktarıldı (İdrar 50 ml çizgisine kadar doldurulabilir).
- 2) Tüpler 15 dakika 3500 devir/dakika hızla (rotor yarıçapı 20 cm olan satrifüjde) çevrildi.
- 3) Üst sıvı, dezenfektan içeren kaba dikkatlice döküldü. Cam boncukların üzerine yaklaşık 3 ml Sodyum Hidroksit – Sodyum Sitrat çözeltisi eklendi. Tüpün ağzı sıkıca kapatıldı.
- 4) Vorteksle çalkalayarak örneğin homojenize olması sağlandı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 5) Örnek tüpünün 50 ml çizgisine gelecek şekilde fosfat tamponu çözeltisi dolduruldu (Artan fosfat tamponu çözeltisi diğer basamaklar için saklandı).

- 6) Tüpler 15 dakika 3500 devir/dakika hızla (rotor yarıçapı 20 cm olan satrifüjde) çevrildi.
- 7) Üst sıvı, dezenfektan içeren kaba, cam boncuklar dökülmeyecek şekilde dikkatlice boşaltıldı.
- 8) Artan fosfat tamponu çözeltisi, örnek tüpüne 5 ml çizgisine erişene dek eklendi. Cam boncuklar arasında kalan çökelti vorteksle çalkalanarak yeniden süspansiyon haline getirildi.

3.5. pH Ölçümü

Her iki homojenizasyon dekontaminasyon yöntemiyle işlenmiş örnekler kültür besiyerine ekimleri yapılmadan önce pH'ları ölçülerek not edildi. Bunun için yaklaşık 500 µl işleme ürünü, steril pipet uçları kullanılan otomatik pipetle yaklaşık 5 ml steril distile su içeren tüpe aktarıldı. Tüpün ağzı kapatılıp karıştırıldıktan sonra, tüpün kapağı açılarak pH-metre ile örneklerin pH'ları ölçülerek not edildi. pH-metre ile her ölçümden sonra pH-metre distile su ile yıkandı ve steril gazlı bez ile silindi.

3.6. Homojenizasyon-Dekontaminasyon Sonrası İşlenmiş Örneklerden EZN Boyama

Her iki yöntemin işleme ürünlerinden birkaç öze alınıp rodajlı lama yayılarak preparat yapıldı. Yayma havada kurutuldu, EZN boyama yöntemi ile boyandı ve mikroskopta immersiyon objektifinde incelendi. Kırmızı basillerin görülmesi ARB pozitif olarak değerlendirildi. Preparatların değerlendirilmesinde 300 saha incelendi ve Tablo 3.1' deki ölçütlere göre değerlendirildi ve not edildi.

3.7. Löwenstein – Jensen Kültür Besiyerine Ekim

Her iki yöntemle işlenmiş örnekler, yatık olarak hazırlanmış ikişer adet Löwenstein-Jensen besiyerine (Salubris A.Ş), steril pipet ucu kullanılan otomatik pipetle 300'er µl ekildi. Uygun biçimde kapağa temas etmeyecek şekilde besiyerinin içindeki sıvının, besiyerinin yüzeyine yayılması sağlandı. Ekim yapılan tüplerdeki besiyerleri 1 gün yatık halde 37° C'deki etüvde inkübe edildi. 24 saat sonra dik

olarak, sepetlere yerleştirilerek, 37° C’de etüvde 50 gün süreyle izlendi. Yapılan kültür kontrollerinde kültür kontaminasyonu olanlardan (kültür besiyeri bozulanlardan) ve üreme olan tüplerdeki kolonilerden EZN boyama yöntemiyle boyandı. Mikroskopta immersiyon objektifinde incelendi ve sonuçlar not edildi. Kolonilerin ilk görüldüğü gün ve koloni sayıları Tablo 2.5’e göre not edildi. Ekim günü ile koloni veya kolonilerin ilk görüldüğü gün arasındaki fark üreme süresi olarak not edildi. 50 gün sonunda üreme görülmeyen tüplerden yayma yapılarak, EZN boyama yöntemiyle boyandı ve mikroskopta immersiyon objektifinde incelendi ve ARB negatif olan sonuçlar, üreme olmadı anlamında “negatif” olarak değerlendirildi.

3.8. İstatistiksel Hesaplamalar

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (Ortalama, Standart sapma, frekans dağılımı) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin değerlendirmeleri “oneway anova test” ve “student t test”; grup içi karşılaştırmalarında “paired sample t” testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise “McNemar” testi ve tanı tarama testleri (duyarlılık, özgüllük vb.) ve Ki-kare testi kullanıldı. Sonuçlar % 95’lik güven aralığında, anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

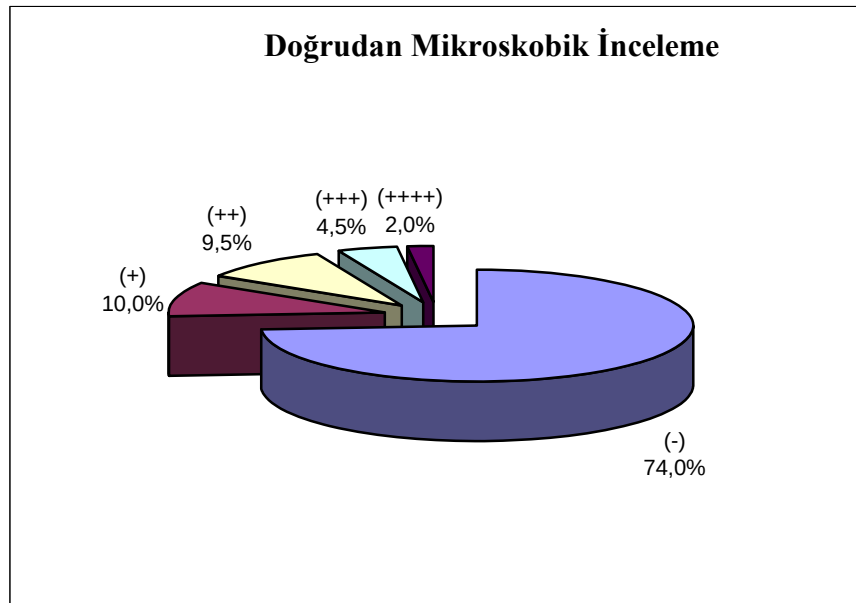
Toplam 200 olgu üzerinde yapılan çalışmada modifiye Petroff örnek işleme yönteminde pH ölçümleri 7,01 ile 12,50 arasında değişmekte olup ortalama $9,63 \pm 1,49$; NaOH + N-Asetil L-Sistein (NaOH + NALC) yöntemi temel alınarak hazırlanmış bir dekontaminasyon ve konsantrasyon kiti (MycoProSafe) ile işleme yöntemindeki pH ölçümleri ise 7,07 ile 10,30 arasında değişmekte olup ortalama $7,82 \pm 0,52$ 'dir. Modifiye Petroff yöntemi ile işlenip, Löwenstein Jensen besiyerinde üreme olan olgularda üreme günleri 5 ile 42 gün arasında değişmekte olup ortalama $20,54 \pm 7,42$ gün; MycoProSafe ile işlenmiş olgularda ise 5 ile 38 gün arasında değişmekte olup ortalama $18,31 \pm 6,20$ gündür.

Tablo 4.1. Olguların doğrudan, işleme sonrası mikroskopik inceleme ve kültür besiyerinde üreme olup olmama durumuna göre değerlendirilmesi

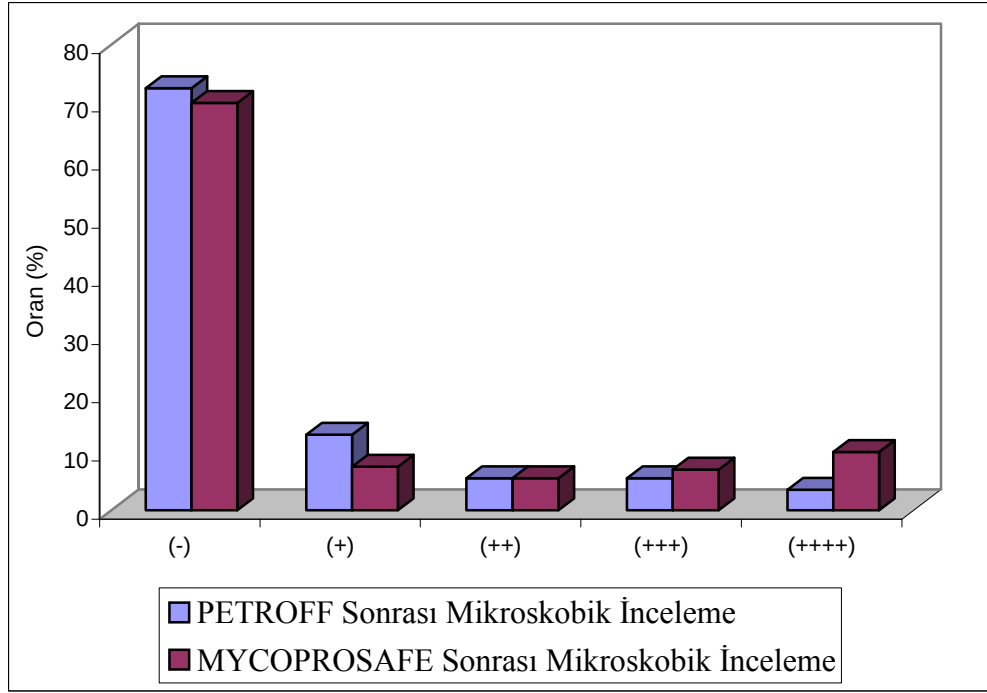
	Sonuç	n: Olgu sayısı	%
Doğrudan Mikroskopik İnceleme	-	148	74,0
	+	20	10,0
	++	19	9,5
	+++	9	4,5
	++++	4	2,0
	Toplam pozitif	52	26,0
PETROFF sonrası Mikroskopik İnceleme	-	145	72,5
	+	26	13,0
	++	11	5,5
	+++	11	5,5
	++++	7	3,5
	Toplam pozitif	55	27,5
MYCOPROSAFE Sonrası Mikroskopik İnceleme	-	140	70,0
	+	15	7,5
	++	11	5,5
	+++	14	7,0
	++++	20	10,0
	Toplam pozitif	60	30,0
PETROFF Kültür Sonuçları	Kültür (-)	124	62,0
	Kültür (+)	58	29,0
	Kültür Kontaminasyonu	18	9,0
MYCOPROSAFE Kültür Sonuçları	Kültür (-)	114	57,0
	Kültür (+)	69	34,5
	Kültür Kontaminasyonu	17	8,5

Tabo 4.1' de klinik örneklerden yapılan yaymaların doğrudan EZN boyama sonuçlarının dağılımları doğrudan mikroskopik inceleme ile olguların % 74,0'ı ARB negatif (-), % 10,0'ı (+), % 9,5'i (++), %4,5'i (+++) ve % 2,0'ı (++++) bulunmuştur. Modifiye Petroff yöntemi ile işlenmiş örneklerden yapılan yaymaların EZN boyama sonuçlarının mikroskopik inceleme sonuçlarının dağılımında ise örneklerin %72,5'i negatif % 13,0'ı (+), % 5,5'i (++), %5,5'i (+++) ve % 3,5'i (++++) bulunmuştur. Mycoprosafe kiti ile işlenmiş örneklerden yapılan yaymaların EZN boyama sonuçlarının mikroskopik incelemesinde örneklerin % 70,0'ı negatif, % 7,5'i (+), % 5,5'i (++), %7,0'ı (+++) ve % 10,0'ı (++++) şeklindedir. Modifiye Petroff yöntemi ile işlenen olgularda Löwenstein Jensen kültür besiyerinde örneklerin %62,0'ında kültür sonucu negatif (üreme olmadı), %29,0'ında kültür sonucu pozitif (üredi) ve % 9,0 oranında kültür kontaminasyonu saptanmıştır. Mycoprosafe kiti ile işlenen örneklerin ise %57,0'sinde kültür sonucu negatif (üreme olmadı); %34,5'inde kültür sonucu pozitif (üredi) ve % 8,5'inde kültür kontaminasyonu saptanmıştır.

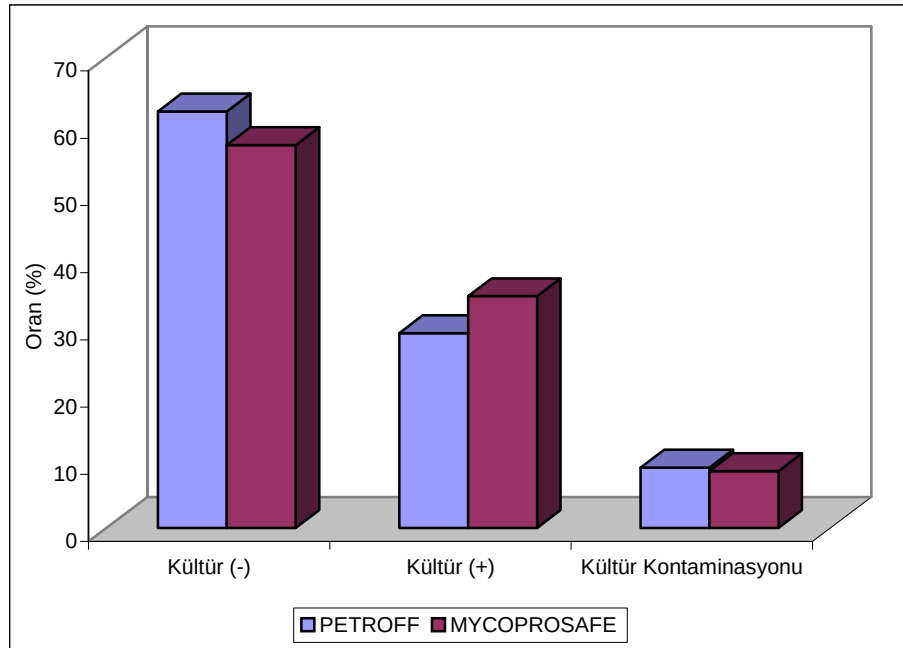
Olguların doğrudan mikroskopik inceleme sonuçlarının dağılımı Grafik 4.1'de gösterilmiştir. Petroff ve Mycoprosafe ile örneklerin işlenmesi sonrası mikroskopik inceleme sonuçlarının dağılımları Grafik 4.2'de, Petroff ve Mycoprosafe kit kullanılan yöntemlere göre kültür sonuçlarının dağılımları Grafik 4.3'te gösterilmiştir.



Grafik 4.1. Olguların doğrudan mikroskopik inceleme sonuçlarının dağılımı



Grafik 4.2. Petroff ve Mycoprosafe ile örneklerin işlenmesi sonrası mikroskopik inceleme sonuçlarının dağılımları



Grafik 4.3. Petroff ve Mycoprosafe kit kullanılan yöntemlere göre kültür sonuçlarının dağılımları

Tablo 4.2. Petroff ve Mycoprosafe sonrası mikroskopik inceleme sonuçlarının değerlendirilmesi

PETROFF Sonrası Mikroskopik İnceleme	MYCOPROSAFE Sonrası Mikroskopik İnceleme						p; test değeri
	(-) n(%)	(+) n(%)	(++) n(%)	(+++) n(%)	(++++) n(%)	Toplam n(%)	
(-) n(%)	140(%70,0)	3(%1,5)	-	1(%0,5)	1(%0,5)	145(%72,5)	MN:285,0 p:0,001**
(+) n(%)	-	12(%6,0)	6(%3,0)	5(%2,5)	3(%1,5)	26(%13,0)	
(++) n(%)	-	-	4(%2,0)	4(%2,0)	3(%1,5)	11(%5,5)	
(+++) n(%)	-	-	-	4(%2,0)	7(%3,5)	11 (%5,5)	
(++++) n(%)	-	-	1(%0,5)	-	6(%3,0)	7(%3,5)	
Toplam n(%)	140(%70,0)	15(%7,5)	11(%5,5)	14(%7,0)	20(%10,0)	200(%100)	

** p<0,01

MN: Mc Nemar Testi

n:Olgu Sayısı

Tablo 4.2'ye göre Petroff ve Mycoprosafe ile işlenen örneklerin mikroskopik inceleme sonuçlarının değerlendirilmelerinde anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,01$). Petroff sonrası mikroskopik incelemede ARB negatiflerin oranı % 72,5 iken, Mycoprosafe'de bu oran % 70 olarak saptanmıştır; Mycoprosafe sonrası mikroskopik incelemede 200 örnekten 60 örnekte (%30) pozitiflik saptanırken, Petroff sonrası mikroskopik inceleme de 55 örnekte (% 27,5) pozitiflik saptanmıştır. Her iki yöntemde de mikroskopik inceleme sonrası incelemelerde pozitif bulunan olguların kendi aralarında pozitiflik derecelerinin değerlendirilmesine göre; (+) görülme oranı Petroff ta %13,0 iken, Mycoprosafe'de bu oran % 7,5'tir; (++) görülme oranı Petroff ta %5,5 iken, Mycoprosafe'de % 5,5'tir; (+++) görülme oranı Petroff ta %5,5 iken, Mycoprosafe'de bu oran % 7,0'dır; (++++) görülme oranı Petroff ta %3,5 iken, Mycoprosafe'de bu oran %10'dur. (++++) ve (+) olgulardaki farklar dikkat çekicidir.

Tablo 4.3. Petroff ve Mycoprosafe sonrası ölçülen pH sonuçlarının değerlendirilmesi

	pH			p; test değeri
	Ort	SD	Farkın Ort $\pm$ SD	
PETROFF Sonrası	9,63	1,49	1,81 $\pm$ 1,55	t:16,491 p:0,001**
MYCOPROSAFE Sonrası	7,82	0,52		

**p<0,01

Ort: Ortalama

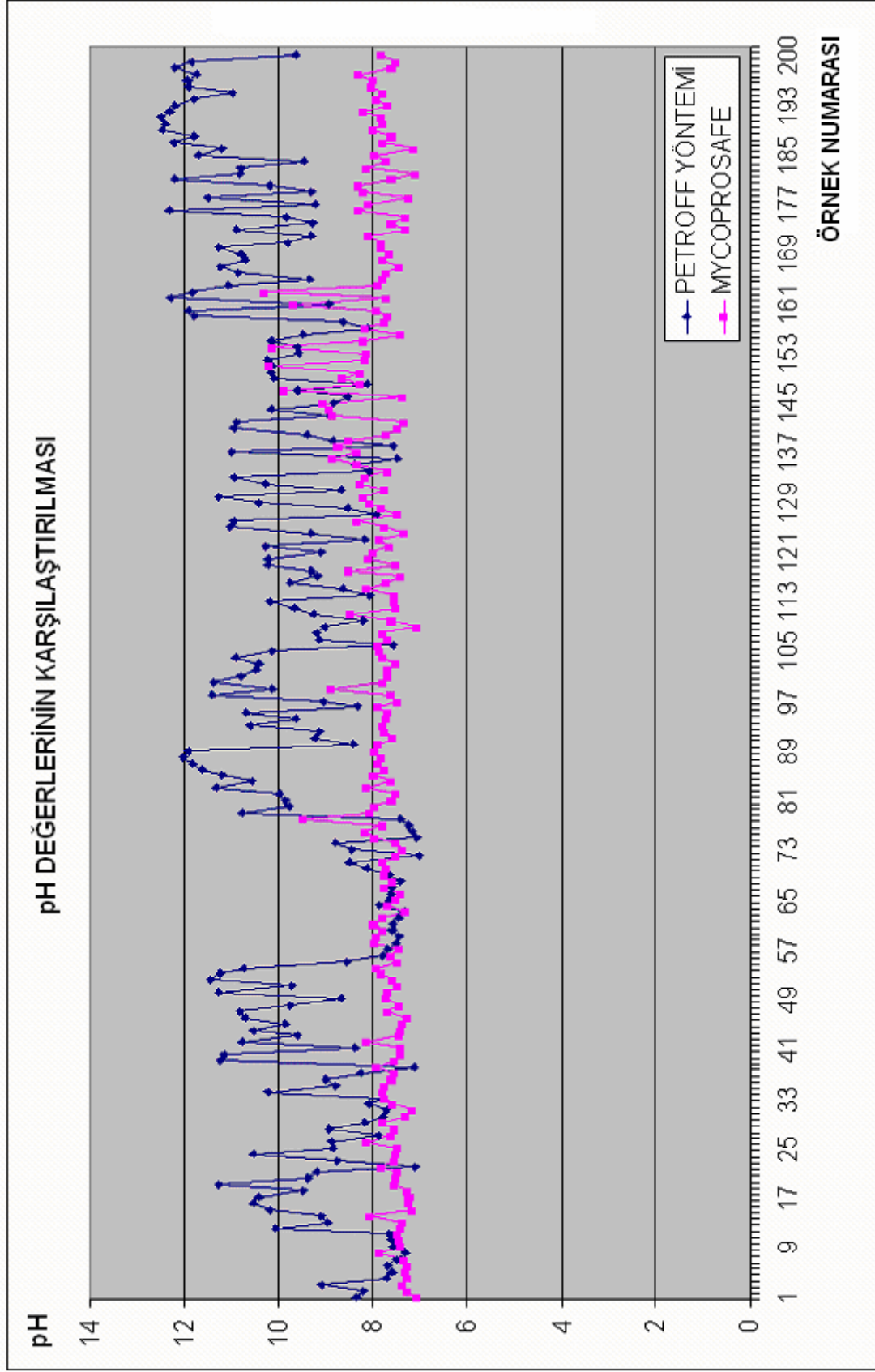
t: Paired Sample Testi

SD: Standart Sapma

Tablo 4.3 te, Modifiye edilmiş Petroff yöntemine göre klinik örneklerin işleme ürünlerinden ölçülen pH sonuçları, Mycoprosafe kiti ile işleme sonrası ölçülen pH sonuçlarından anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır ($p<0,01$).Petroff ve Mycoprosafe'in pH farkları ise ortalama olarak $1,81 \pm 1,55$ olarak saptanmıştır.

Modifiye edilmiş Petroff yönteminde klinik örneklerin işleme ürünlerinden 8 ve üzeri ölçülmüş pH değerlerine sahip olgu sayısı 163, Mycoprosafe'de 49'dur.

Petroff ve Mycoprosafe ile işleme sonrası örneklerden ölçülen pH değerlerinin karşılaştırılması Grafik 4.4'te verilmiştir.



Grafik 4.4. Petroff ve Mycoprosafe ile işleme sonrası örneklerden ölçülen pH değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.4. Petroff sonrası ölçülen pH değeri aralıklarına göre kültür sonuçları ve ortalama üreme sürelerinin dağılımı

		PETROFF Sonrası pH Aralıkları								p; test değeri
		7-8 (n=35)		8-9 (n=32)		9-10 (n=36)		10 ve üzeri (n=79)		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
PETROFF Kültür Sonuçları	(-)	21	60,0	14	43,8	27	75,0	62	78,5	χ²:14,507 p:0,002**
	(+)	14	40,0	18	56,3	9	25,0	17	21,5	
		Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	
Ortalama Üreme Süresi		19,53	4,50	18,27	6,24	17,88	5,96	25,11	9,26	F:3,613 p:0,019*

F: Oneway Anova testi

χ^2 : Ki-kare testi

n:Olgu Sayısı

*p<0,05 Anlamlı

**p<0,01 İleri Düzeyde Anlamlı

Ort:Ortalama

SD:Standart Sapma

Tablo 4.4’de Petroff sonrası ölçülen pH değeri aralıklarına göre kültür pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p<0,01). pH aralığı 7-8 ve 8-9 olan olgular yüksek düzeyde kültür pozitifliği göstermişlerdir; pH 9-10 ve pH 10 ve üzeri aralıklarda ise kültür negatifliği oranları anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Petroff sonrası ölçülen pH değeri aralıklarına göre ortalama üreme sürelerinin dağılımı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p<0,05). pH aralığı 8-9 olan olguların üreme süreleri pH 10 ve üzeri aralığa sahip olan olgulara göre anlamlı düzeyde kısa bulunmuştur (p:0,027). Diğer değerlendirmeler anlamlı farklılık göstermemektedir.

Tablo 4.5. Mycoprosafe sonrası ölçülen pH değeri aralıklarına göre kültür sonuçları ve ortalama üreme sürelerinin dağılımı

		MYCOPROSAFE Sonrası pH Aralıkları								p; test değeri;
		7-8 (n=138)		8-9 (n=38)		9-10 (n=4)		10 ve üzeri (n=3)		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
MYCOPROSAFE Kültür Sonuçları	(-)	81	58,7	28	73,7	2	50,0	3	100	χ^2 :4,933 p:0,177
	(+)	57	41,3	10	26,3	2	50,0	-	-	
		Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	
Ortalama Üreme Süresi		18,15	6,25	20,10	6,17	14,00	4,24	-	-	t:0,908 p:0,367

t: Student t Testi

χ^2 : Ki-kare Testi

Ort: Ortalama SD: Standart Sapma

n: Olgu Sayısı

Ortalama üreme süreleri 7-8 ve 8-9 aralığı için değerlendirilmiştir.

Tablo 4.5'te Mycoprosafe sonrası ölçülen pH değeri aralıklarına göre kültür pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). pH aralığı 8-9 olan olgularda kültür (-) oranları dikkat çekici derecede yüksek bulunmuştur.

Mycoprosafe sonrası ölçülen pH değeri aralıklarına göre ortalama üreme sürelerinin dağılımı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). Değerlendirme sadece 7-8 ve 8-9 aralığı için yapılmıştır; diğer aralıklarda olgu sayısı yetersizdir.

Tablo 4.6. Petroff ve Mycoprosafe ile işlenmiş örneklerin kültür sonuçlarının dağılımları

PETROFF Kültür Sonuçları	MYCOPROSAFE Kültür Sonuçları			
	Kültür (-)	Kültür (+)	Kültür Kontaminasyonu	Toplam
Kültür (-)	107(%53,5)	13(%6,5)	4(%2,0)	124(%62,0)
Kültür (+)	3(%1,5)	55(%27,5)	-	58(%29,0)
Kültür Kontaminasyonu	4(%2,0)	1(%0,5)	13(%6,5)	18(%9,0)
Toplam	114(%57,0)	69(%34,5)	17(%8,5)	200(%100)

Tablo 4.6’ da Modifiye Petroff yöntemi ile işlenip, Löwenstein Jensen kültür besiyerinde izlenen olgularda, kültür negatiflik oranı %62,0 iken, Mycoprosafe’de bu oran % 57,0’dır; kültür pozitifliği Petroff’ta % 29,0 iken Mycoprosafe’de bu oran % 34,5’tir; Petroff’ta kültür kontaminasyonu %9,0 oranında iken Mycoprosafe’de % 8,5 oranındadır. Çalışmamızda modifiye edilmiş Petroff yöntemi ve Mycoprosafe kiti ile işlenen olguların her ikisinde de kültür besiyeri kontamine olan 13 hastada (% 6,5), kontaminasyona neden olan suşların genelde *Pseudomonas* cinsi bakteriler olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.7. Petroff ve Mycoprosafe ile işlenmiş örneklerin kültür pozitifliği ve kültür negatifliğine göre dağılımları

PETROFF Kültür Sonuçları	MYCOPROSAFE Kültür Sonuçları			p; test değeri
	Kültür (-)	Kültür (+)	Toplam	
Kültür (-)	107(%60,1)	13(%7,3)	120(%67,4)	MN:116,8 p:0,021*
Kültür (+)	3(%1,7)	55(%30,9)	58(%32,6)	
Toplam	110(%61,8)	68(%38,2)	178(%100)	

*p<0,05;

MN: McNemar Testi

Tablo 4.7’de kültür sonuçlarına göre Petroff ve Mycoprosafe dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$). Petroff’ta kültür pozitiflik oranı %32,6 iken Mycoprosafe’de bu oran % 38,2 olup daha yüksek olarak saptanmıştır.

Tablo 4.8. Petroff ve Mycoprosafe ile işlenmiş örneklerin kültürlerinin her ikisinde de kültürü pozitif olan olgulara göre üreme sürelerinin (gün) değerlendirilmesi

	Üreme Süresi (Gün)			p; test değeri
	Ort	SD	Farkın Ort $\pm$ SD	
PETROFF	20,74	7,39	3,48 $\pm$ 5,91	t:4,329; p:0,001**
MYCOPROSAFE	17,25	5,63		

**p<0,01

Ort: Ortalama

t: Paired Sample Testi

SD: Standart Sapma

Tablo 4.8’ de Petroff ve Mycoprosafe kültürlerin her ikisinde de kültürü pozitif olan olgularda; Mycoprosafe’de kültür besiyerinde mikobakterilerin üreme süreleri (gün) ortalaması Petroff’ a göre anlamlı düzeyde düşük olarak saptanmıştır ($p<0,01$). Petroff’a göre Mycoprosafe’de üreme süresi farkı ortalaması ise $3,48 \pm 5,91$ ’dir.

Tablo 4.9. Petroff ve Mycoprosafe ile işlenmiş örneklerde kültür pozitif olguların kültür pozitifliğinin derecesinin değerlendirilmesi

Kültür Sonuçları	PETROFF		MYCOPROSAFE	
	n:olgu sayısı	%	n:olgu sayısı	%
50 koloniden az	19	33,5	20	28,7
50-100 koloni (+)	4	7,0	4	5,8
100-200 koloni (++)	10	17,5	1	1,4
200-500 koloni(+++)	9	15,8	14	20,3
500 koloniden daha fazla koloni (++++)	15	26,3	30	43,5
Toplam	57	100	69	100

Tablo 4.9'a göre, 50 koloniden az üreme Petroff'ta 19 olguda (%33,5), Mycoprosafe'de 20 olguda (%28,7); (+) üreme Petroff'ta 4 olguda (%7,0), Mycoprosafe'de 4 olguda (%5,8); (++) üreme Petroff'ta 10 olguda (%17,5), Mycoprosafe'de 1 olguda (%1,4); (+++) üreme Petroff'ta 9 olguda (%15,8); Mycoprosafe'de 14 olguda (%20,3) ve (+++++) üreme Petroff'ta 15 olguda (%26,3); Mycoprosafe'de ise 30 olguda (%43,5) görülmüştür.

Tablo 4.10. Doğrudan, Petroff sonrası ve Mycoprosafe sonrası mikroskopik incelemeler ile Petroff ve Mycoprosafe kültür sonuçlarının dağılımı

Doğrudan Mikroskopik İnceleme	PETROFF Sonrası Mikroskopik İnceleme	MYCOPROSAFE Sonrası Mikroskopik İnceleme	PETROFF Kültür Sonucu	MYCOPROSAFE Kültür Sonucu	n:olgu sayısı	%
-	-	-	-	-	104	52,0
-	-	-	-	+	9	4,5
-	-	-	-	KK	4	2,0
-	-	-	+	-	3	1,5
-	-	-	+	+	5	2,5
-	-	-	KK	-	3	1,5
-	-	-	KK	KK	12	6,0
-	-	+	-	+	2	1,0
-	+	+	+	+	6	3,0
+	-	+	-	+	1	0,5
+	-	+	+	+	1	0,5
+	-	+	KK	-	1	0,5
+	+	+	-	-	3	1,5
+	+	+	-	+	1	0,5
+	+	+	+	+	43	21,5
+	+	+	KK	+	1	0,5
+	+	+	KK	KK	1	0,5

*KK : Kültür Kontaminasyonu

Mikroskopik inceleme (-) Negatif: Aside Dirençli Basil görülmedi

Mikroskopik inceleme (+) Pozitif: Aside Dirençli Basil görüldü

Kültür sonucu (-) Negatif: Üreme olmadı

Kültür sonucu (+) Pozitif: Üredi

Tablo 4.10'a göre, doğrudan mikroskopik inceleme, Petroff sonrası ve Mycoprosafe sonrası mikroskopik inceleme sonuçları negatif iken; Petroff' ta kültür sonucu negatif ve Mycoprosafe'de kültür sonucu negatif olan olgu sayısı 104 (% 52,0); Petroff'ta kültür sonucu negatif, Mycoprosafe'de kültür sonucu pozitif olan olgu sayısı 9 (% 4,5); Petroff'ta kültür sonucu negatif, Mycoprosafe'de kültür kontaminasyonu olan olgu sayısı 4 (% 2,0); Petroff'ta kültür sonucu pozitif, Mycoprosafe'de kültür sonucu negatif olan olgu sayısı 3 (% 1,5); Petroff'ta kültür sonucu pozitif, Mycoprosafe'de kültür sonucu pozitif olan olgu sayısı 5 (%2,5); Petroff'ta kültür sonucu pozitif, Mycoprosafe'de kültür kontaminasyonu olan olgu sayısı 1 (% 0,5); Petroff'ta kültür kontaminasyonu olup Mycoprosafe'de kültür sonucu negatif olan olgu sayısı 3 (%1,5); Petroff ve Mycoprosafe'de kültür kontaminasyonu olan olgu sayısı 12 (%6,0)'dir.

Doğrudan mikroskopik inceleme ve Petroff sonrası mikroskopik incelemesi negatif olup, Mycoprosafe sonrası mikroskopik incelemesi pozitif iken; Petroff ' ta kültür sonucu negatif ve Mycoprosafe'de kültür sonucu pozitif olan olgu sayısı 2 (%1,0)'dir.

Doğrudan mikroskopik incelemesi negatif olup, Petroff ve Mycoprosafe sonrası mikroskopik incelemeleri pozitif iken; Petroff 'ta ve Mycoprosafe'de kültür sonucu pozitif olan olgu sayısı 6 (%3,0)'dir.

Doğrudan mikroskopik incelemesi ve Mycoprosafe sonrası mikroskopik inceleme sonuçları pozitif olup, Petroff sonrası mikroskopik incelemesi negatif iken; Petroff'ta kültür sonucu negatif, Mycoprosafe'de kültür sonucu pozitif olan olgu sayısı 1 (% 0,5); Petroff'ta ve Mycoprosafe'de kültür sonucu pozitif olan olgu sayısı 1 (%0,5); Petroff'ta kültür kontaminasyonu olup Mycoprosafe'de kültür sonucu negatif olan olgu sayısı 1 (%0,5)'dir.

Doğrudan mikroskopik incelemesi, Petroff sonrası ve Mycoprosafe sonrası mikroskopik inceleme sonuçları pozitif iken; Petroff ve Mycoprosafe'de kültür sonucu negatif olan olgu sayısı 3 (%1,5); Petroff'ta kültür sonucu negatif, Mycoprosafe'de kültür sonucu pozitif olan olgu sayısı 1(%0,5); Petroff ve Mycoprosafe'de kültür sonucu pozitif olan olgu sayısı 43 (%21,5); Petroff'ta kültür

kontaminasyonu olup Mycoprosafe’de kültür sonucu pozitif olan olgu sayısı 1 (%0,5); Petroff ve Mycoprosafe’de kültür kontaminasyonu olan olgu sayısı ise 1 (%0,5)’dir.

Petroff kültür sonuçlarına göre, Petroff sonrası mikroskobinin değerlendirilmesi;

PETROFF DUYARLILIK

a : Petroff işleme yöntemi sonrası mikroskobik incelemede pozitif çıkan olgular (55 olgu)

b : Petroff kültürde ve Mycoprosafe kültürün her ikisinde de kültür sonucu pozitif olan olgular (55 olgu)

c : Petroff yönteminde kültür sonucu pozitif olup, Mycoprosafe kültürde negatif olan olgular (3 olgu)

d : Petroff yönteminde kültür sonucu negatif olup, Mycoprosafe de kültür sonucu pozitif olan olgular (13 olgu)

$$\text{Duyarlılık} = \frac{a}{b + c + d} \times 100 = \frac{55}{55 + 3 + 13} \times 100 = \% 77,4$$

PETROFF ÖZGÜLLÜK

a: Petroff işleme yöntemi sonrası mikroskobik incelemede negatif olan olgular içerisinde kültür sonucu her iki yöntemle(Petroff yöntemi ve Mycoprosafe kit) pozitif çıkan olgular (104 olgu)

b: Petroff sonrası mikroskopla incelemede pozitif çıkanlar içerisinde kültür sonuçları da yöntemlerden biri veya ikisi ile pozitif çıkan olgular (50 olgu)

c: Toplam olgu sayısı (182 olgu)

$$\text{Özgüllük} = \frac{a + b}{c} \times 100 = \frac{104 + 50}{182} \times 100 = \%84,6$$

PETROFF POZİTİF KESTİRİM DEĞERİ

- a: Petroff sonrası mikroskopik incelemede pozitif çıkan olgular (53olgu)
- b: Petroff kültürde ve mycoprosafe kültürün her ikisinde de kültür sonucu pozitif olan olgular (55 olgu)
- c: Petroff işleme yöntemi sonrası mikroskopik incelemede pozitif çıkan olgulardan, kültür sonucu her iki yöntemden birisinde veya ikisinde negatif olanlar (4 olgu)

$$\text{Pozitif Kestirim Değeri} = \frac{a}{b+c} \times 100 = \frac{53}{55+4} \times 100 = \% 89,8$$

PETROFF NEGATİF KESTİRİM DEĞERİ

- a: Petroff işleme yöntemi sonrası mikroskopik incelemede negatif çıkan olgular (125 olgu)
- b: Petroff kültürde ve Mycoprosafe kültürün her ikisinde de kültür sonucu negatif olan olgular (107 olgu)
- c: Petroff işleme yöntemi sonrası mikroskopik incelemede negatif çıkan olgulardan kültür sonucu her iki yöntemden birisinde veya ikisinde pozitif olanlar (21 olgu)

$$\text{Negatif Kestirim Değeri} = \frac{a}{b+c} \times 100 = \frac{125}{107+21} \times 100 = \% 97,6$$

Mycoprosafe kültür sonuçlarına göre, Mycoprosafe sonrası mikroskobinin değerlendirilmesi;

MYCOPROSAFE DUYARLILIK

- a: Mycoprosafe sonrası mikroskopik incelemede pozitif çıkan olgular (60 olgu)
- b: Mycoprosafe kültürde ve Petroff kültürün her isinde de kültür sonucu pozitif olan olgular (55 olgu)
- c: Mycoprosafe de kültür sonucu pozitif olup, Petroff kültürde sonucu negatif olan olgular (13 olgu)

d: Mycoprosafe de kültür sonucu negatif olup, Petroff kültürde sonucu pozitif olan olgular (3 olgu)

$$\text{Duyarlılık} = \frac{a}{b+c+d} \times 100 = \frac{60}{55+13+3} \times 100 = \% 84,5$$

MYCOPROSAFE ÖZGÜLLÜK

a: Mycoprosafe sonrası mikroskopik incelemede negatif olanlar içerisinde, kültür sonuçları her iki yöntemle de negatif çıkan olgular (104 olgu)

b: Mycoprosafe sonrası mikroskopik incelemede pozitif çıkanlar içerisinde kültür sonuçları yöntemlerin biri veya ikisi ile pozitif çıkanlar (54 olgu)

c. Toplam olgu sayısı (183 olgu)

$$\text{Özgüllük} = \frac{a+b}{c} \times 100 = \frac{104+54}{183} \times 100 = \%86,3$$

MYCOPROSAFE POZİTİF KESTİRİM DEĞERİ

a: Mycoprosafe sonrası mikroskopik incelemede pozitif çıkan olgular (57olgu)

b: Mycoprosafe kültürde ve Petroff kültürün her ikisinde de kültür sonucu pozitif olan olgular (55 olgu)

c: Mycoprosafe işleme yöntemi sonrası mikroskopik incelemede pozitif çıkan olgulardan, kültür sonucu her iki yöntemden birisinde veya ikisinde negatif olanlar (7 olgu)

$$\text{Pozitif Kestirim Değeri} = \frac{a}{b+c} \times 100 = \frac{57}{55+7} \times 100 = \% 91,9$$

MYCOPROSAFE NEGATİF KESTİRİM DEĞERİ

a: Mycoprosafe sonrası mikroskopik incelemede negatif çıkan olgular (121 olgu)

b: Mycoprosafe kültürde ve Petroff kültürün her ikisinde de kültür sonucu negatif olan olgular (107 olgu)

c: Mycoprosafe işleme yöntemi sonrası mikroskopik incelemede negatif çıkan olgulardan, kültür sonucu her iki yöntemden birisinde veya ikisinde pozitif olanlar (17 olgu)

$$\text{Negatif Kestirim Değeri} = \frac{a}{b+c} \times 100 = \frac{121}{107+17} \times 100 = \% 97,5$$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüberkülozun tanısında en önemli yöntemlerden olan mikroskopik inceleme ve kültür yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılıkları büyük oranda hastalardan alınan örneklerle iyi homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemlerinin uygulanmasına bağlıdır. Bu yöntemler, homojenizasyon, dekontaminasyon nötralizasyon ve konsantrasyon, basamaklarını içerirler. Bugüne dek tanımlanmış dünya genelinde yaygın kullanım alanı bulan homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemlerinin birçoğu akciğer tüberkülozu tanısı amacıyla balgam örneklerini işlemeyi temel alan, küçük ve büyük ölçekli laboratuvarlarda rahatlıkla uygulanabilmesi amacıyla geliştirilmiş yöntemlerdir. Bu yöntemlerde farklı kimyasal maddeler, laboratuvar alet ve cihazları kullanılmasına rağmen temel amaç aynıdır. Tüm yöntemler örneklerdeki mikobakteriler dışındaki mikroorganizmaları önlemek, mikobakterileri ise küçük bir hacimde toplamayı hedeflemektedir. Hiçbir yöntem her laboratuvarda uygulanabilecek ideal bir yöntem değildir. Her bir yöntemin kendine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Mikobakteri izole etmeye çalışan bir laboratuvar, laboratuvarında yer alan biyogüvenlik koşulları, laboratuvar donanımı (alet, cihaz, kimyasal maddelerin sorunsuz ve ucuz sağlanması, günlük çalışma yükü, deneyimli ve yeterli sayıda personel), örneklerin tipi, örneklerin mikobakteri dışı organizmalarla kontaminasyon durumları gibi kriterleri göz önüne alarak kendine en uygun homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemini seçmelidir (<http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler.>, 2005).

Homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri aslında klinik örnek içindeki mikobakterileri korumayı amaçlamakla birlikte yöntem türüne ve kullanılan kimyasal maddelere göre değişik düzeylerde mikobakteri kaybına da yol açmaktadır. Çalışmamızda incelenen her iki homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminde de eşit miktarda örnek kullanılmıştır. Süreyyapaşa Hastanesi'nde kullanılmakta olan modifiye edilmiş Petroff yönteminin uygulamasında örnek miktarı en fazla 2 ml olacak şekilde işlenmekte, örneğin 2-4 katı kadar %4' lük NaOH kullanılmakta ve bekleme süresi 30 dakikadır. NaOH yoğun konsantrasyonda kullanıldığında ve işlem süresi uzatıldığında bol miktarda mikobakteri kaybına yol açabilmektedir. Çalışmada bu durumun işleme ürünlerinden yapılan yaymalardaki EZN boyama sonuçlarına ve

kültürden mikobakteri izolasyon oranlarına da yansdığı görülmektedir. Mycoprosafe kiti ile kullanılan yöntemde ise NaOH' in konsantrasyonu %3 olup, örnek miktarına eşit miktarda NaOH-sodyum sitrat eklenmektedir ve dekontaminasyon süresi 15 dakikadır. Bu nedenle daha az mikobakteri kaybına yol açmakta ve bu durumun işleme ürünleri sonunda yapılan yaymalardaki EZN boyama sonuçlarına ve kültür pozitifliğine yansdığı görülmektedir. Çalışmamızda günlük kullanımdaki modifiye edilmiş Petroff yöntemi ile kültür pozitifliği sayısı 58 (% 29) iken, NaOH + N-Asetil L-Sistein (NaOH + NALC) yöntemi temel alınarak hazırlanmış bir dekontaminasyon ve konsantrasyon kiti (Mycoprosafe -Salubris A.Ş) ile işlenmiş örneklerden yapılan kültürlerde, kültür pozitifliği sayısı daha fazla olup, 69 (% 34,5) olarak saptanmıştır. Damle ve Kaundinya' nın çalışmasında Petroff yöntemi ile işlenmiş örneklerden elde edilen kültür pozitifliği oranı %80,7 iken NALC-NaOH yönteminde ise % 78,8, bulunmuştur (Damle and Kaundinya., 1986). Buna göre çalışmamız Damle ve Kaundinya' nın çalışması ile uyumlu değildir.

Çalışmamızda NaOH + NALC yöntemi temel alınarak hazırlanmış dekontaminasyon ve konsantrasyon kiti (Mycoprosafe – Salubris A.Ş) ile işleme sonrası yapılan EZN boyamalarında 200 örnekten 60 örnekte (%30) ARB saptanırken, modifiye edilmiş Petroff yönteminde 55 örnekte (% 27,5) ARB saptanmıştır. Her iki yöntemle ARB saptanmış örneklerde mikroskopik incelemede gözlenen basil yoğunluğu NaOH + NALC yöntemi temel alınarak hazırlanmış dekontaminasyon ve konsantrasyon kiti (Mycoprosafe – Salubris A.Ş) ile işlenen kısımda anlamlı bir şekilde fazladır. Buna göre işleme ürünlerinden yapılan EZN ile boyanmış örneklerin mikroskopla inceleme sonuçlarına göre; modifiye Petroff yönteminde 145 örnekte (%72,5) ARB (-) bulunurken, Mycoprosafe kiti kullanılan yöntemde 140 örnek ARB (-) bulunmuştur. Pozitiflik derecesine göre, Modifiye Petroff yönteminde 26 (%13) örnekte ARB (+) bulunurken, Mycoprosafe kiti kullanılan yöntemde 15 (% 7,5) örnek ARB (+) bulunmuştur. Modifiye Petroff yönteminde 11 (%5,5) örnekte ARB (++) bulunurken, Mycoprosafe kiti kullanılan yöntemde 11 (%5,5) örnek ARB (++) bulunmuştur. Modifiye Petroff yönteminde 11 (%5,5) örnekte ARB (+++) bulunurken, Mycoprosafe kiti kullanılan yöntemde 14 (% 7,0) örnek ARB (+++) bulunmuştur. Modifiye Petroff yönteminde 7 (%3,5) örnekte ARB (+++++) bulunurken, Mycoprosafe kiti kullanılan yöntemde 20 (%10,0) örnek ARB (+++++) bulunmuştur. Basil yoğunluğuna göre yapılan pozitiflik

değerlendirilmesinde, ARB (+++++) ve ARB (+) olgulardaki farklar dikkat çekicidir. Basil yoğunluğu farkının temel olarak, modifiye edilmiş Petroff yönteminde örneklerin yeterince homojenize edilememesi (balgam örneklerinin yeterince sıvılaştırılamaması), örneklerle uygulanan dekontaminasyon süresinin uzunluğu (30 dakika) ve örneğin 2-4 katı kadar % 4' lük NaOH kullanımından dolayı mikobakteri kaybındaki artıştan kaynaklandığı düşünülmüştür. Basil yoğunluğu ve ortam pH' ı sınırlı kültürde üremeyi etkilediğinden Mycoprosafe kiti kullanılan yöntemde mikobakteri izolasyon oranı (kültür pozitifliği) daha fazla olup üreme süresi daha kısadır. Homojenizasyon (balgam örneklerini sıvılaştırma) işlemi iyi bir şekilde yapılmazsa örneklerdeki basiller sıvıya geçemez ve işlenmiş örneklerden yapılan mikroskopla incelemede mikobakteri görülmesi ve kültürde üretilmesi şansı azalır. Mycoprosafe kit içeriğinde bulunan 50 ml' lik polipropilen tüpün içinde yaklaşık 40 mg N-Asetil-L-Sistein ve 4 mm çapında cam boncuklar bulunmaktadır. Cam boncuklar işlem sırasında, örneğin kolayca homojenize olmasını sağlamaktadır. Bu yöntemde NALC mukolitik, % 3' lük NaOH dekontamine edici ve mukolitik, % 1,47 trisodyum sitrat.3H₂O klinik örneklerde bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC' ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır. Modifiye edilmiş Petroff yönteminde ise dekontamine edici ve mukolitik olarak sadece NaOH kullanılmakta ve örnek bu madde ile homojenize edilmeye çalışılmaktadır. Ayrıca Modifiye Petroff yönteminde kullanılan tüplerin kısıtlı hacmi (10ml) çalkalama işlemini dolayısıyla homojenizasyonu zorlaştırmaktadır.

Nötralizasyon basamağında Süreyyapaşa Hastanesi'nde kullanılmakta olan modifiye edilmiş Petroff yönteminde, örnek işleme tüpünün küçük (10ml) hacminden dolayı, az miktarda steril distile su kullanılarak ortamdaki NaOH' in etkisi azaltılmaya çalışılmaktadır. Fakat NaOH' in etkisinin yeterli bir şekilde azaltılamadığı görülmektedir. 15 dakika santrifüj işleminden sonra üstsıvı dezenfektan içeren kaba dökülmekte, elde edilen çökeltiyeye brom-timol mavisi ayıraç çözeltisi eşliğinde asit (HCl) ve alkali (NaOH) çözeltilerden damla damla eklenip, tüpler çalkalanmakta ve renk açık mavi veya yeşil hale getirilmeye çalışılmaktadır. Bu yöntemde tek tek pH ayarlaması zaman almakta ve sadece renge bakarak pH ayarlanmasında güçlükler yaşanmaktadır. Ayrıca bu yöntemde NaOH' in HCl ile nötralizasyonunda, ortamda fazla NaCl birikmesine neden olarak kültürde üremeyi olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmektedir. NaOH + NALC yöntemi temel

alınarak hazırlanmış dekontaminasyon ve konsantrasyon kitinde (Mycoprosafe - Salubris A.Ş) ise 50 ml' ye tamamlayacak şekilde, örneğe yeterli miktarda fosfat tampon çözeltisi (pH 6,8) eklenmekte ve nötralizasyon işleminden sonra 15 dakika santrifüj ile çöktürme yapılmaktadır. Tüpün geniş hacmi sayesinde örnek, fosfat tamponu ile kolayca ve homojen olacak bir şekilde karıştırılabilmektedir. Santrifüj işlemi sonunda üst sıvı cam boncuklar dökülmeyecek şekilde dezenfektan içeren kaba dökülür ve 5 ml hizasına kadar fosfat tampon çözeltisi eklenerek kısa bir süre vorteks ile çalkalanır. Bu aşamada ikinci kez eklenen fosfat tamponu pH'nın istenen düzeye çekilmesinde önemli bir rol oynar. Tüpteki cam boncuklar çalkalama sırasında çökeltinin kolayca süspansiyon haline getirilmesini sağlar. Bu aşamada her iki yöntemde de işlenmiş ürünlerden yapılan pH ölçümlerinde önemli farklılıklar bulunmuştur. Çalışmamızda modifiye edilmiş Petroff örnek işleme yönteminde pH ölçümleri 7,01 ile 12,50 arasında değişmekte olup ortalama $9,63 \pm 1,49$; NaOH + N-Asetil L-Sistein (NaOH + NALC) yöntemi temel alınarak hazırlanmış bir dekontaminasyon ve konsantrasyon kiti (Mycoprosafe – Salubris A.Ş) ile işleme yöntemindeki pH ölçümleri ise 7,07 ile 10,30 arasında değişmekte olup ortalama $7,82 \pm 0,52$ bulunmuştur. Mikobakteriler ortalama pH 6-8 aralıklarında en iyi üreyebildiklerinden, her iki yöntem ile işlenmiş örneklerde elde edilen pH farklılığının mikobakteri izolasyon oranını ve izolasyon süresini etkilediği düşünülmektedir.

Her iki yöntemle işlenmiş örneklerden yapılan kültürlerde, ortak üreme olan 54 örnek için ortalama üreme süreleri modifiye Petroff yöntemi ile işlenip, Löwenstein Jensen besiyerinde üreme olan olgularda ortalama 20,74 gün; Mycoprosafe kiti kullanılan olgularda ise ortalama 17,25 gündür. Mycoprosafe kiti ile işlenen olgularda üremenin, modifiye Petroff yöntemi ile işlenenlere göre anlamlı düzeyde ($p < 0,01$) erken saptandığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda Mycoprosafe kiti ile işlenen örneklerin kültürlerinden izole edilen mikobakteri sayısı (kültür pozitiflik derecesine göre) modifiye Petroff yöntemi ile işlenenlerden fazla olduğu gözlenmiştir. Zira 200 hastadan 13 (%6,5) hastanın örneğinde Mycoprosafe kiti ile işlenen olgularda Löwenstein Jensen kültür besiyerinde üreme görülmüş, aynı olguların modifiye edilmiş Petroff yöntemi ile işlenenlerin kültürlerinde üreme görülmemiştir. 3 (% 1,5) hasta örneğinde ise,

modifiye edilmiş Petroff yöntemi ile işlenenlerin kültürlerinde üreme gözlenmiş, Mycoprosafe kiti ile işlenen olgularda üreme gözlenmemiştir. Ayrıca 1 (% 0,5) olguda modifiye edilmiş Petroff yöntemi ile işlenende kültür besiyeri kontamine olmuş, Mycoprosafe kiti ile işlenen kültürde üreme saptanmıştır. Mycoprosafe kiti ile örneklerin işlenmesinin modifiye edilmiş Petroff yöntemine kıyasla, izole edilen mikobakteri sayısını arttırması ve üreme süresini kısaltması nedeniyle, ilaç duyarlılık testlerinin de erken yapılması ve tedavinin doğru yönlendirilmesi açısından son derece önemlidir.

Damle ve Kaundinya' nın çalışmasında Petroff yöntemi ile işlenmiş örneklerde kültür kontaminasyonu oranı % 3,9, NALC-NaOH yönteminde ise % 8,6 bulunmuştur (Damle and Kaundinya., 1986). Bizim çalışmamızda modifiye edilmiş Petroff yöntemi ile işlenenlerde bulunan kontaminasyon oranı % 9, NaOH + NALC yöntemi temel alınarak hazırlanmış dekontaminasyon ve konsantrasyon kiti (Mycoprosafe – Salubris A.Ş) ile işlenenlerde %8.5 bulunmuştur. Buna göre çalışmamız Damle ve Kaundinya' nın çalışması ile uyumlu değildir.

Çalışmamızda modifiye edilmiş Petroff yöntemi ve Mycoprosafe kiti ile işlenen olguların her ikisinde de kültür besiyeri kontamine olan 13 hasta saptanmıştır. Kontaminant organizmaların türleri EZN ve Gram boyama sonrası mikroskopla inceleme, %5 koyun kanlı agar, Müller Hilton agar ve endo agar kültür besiyerlerinde üreme özellikleri, koloni morfolojisi, pigment oluşumu ve daha sonra bazı biyokimyasal testler ile belirlenmiştir. Bu organizmaların genelde *Pseudomonas aeruginosa* olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bu hastaların örneklerine uygulanan her iki homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminin bu organizmaları öldürmekte yetersiz kaldığı ve Löwenstein Jensen kültür besiyerinde *Pseudomonas aeruginosa*'nın üreyerek mikobakterilerin izole edilme şansını ortadan kaldırdığı gözlemlenmiştir. Bundan dolayı daha önce bir örneği *Pseudomonas* cinsi bakteri ile kontamine olan olgularda ya da örnekte *Pseudomonas* olabileceği düşünülüyorsa bu bakteriyi dekontamine edebilen oksalik asit homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile hasta örnekleri işlenmeli ve uygun antibiyotik içeren seçici Löwenstein Jensen besiyerlerine ekimler yapılmalıdır.

Çalışmamızda tedavi gören ve henüz tedavi görmemiş yeni hastaların klinik örneklerinden mikroskopla yapılan incelemelerinde ve bu örneklerden Löwenstein Jensen kültür besiyerine yapılan ekimler sonucundaki üremelerde farklılıklar görülmektedir. Çünkü tüberküloz hastalarında basil salınımı düzensizdir ve tedavi gören hastaların yaymalarında basil görüldüğü halde, kültürlerinde ilaç baskısında iken üreme olmayabilir veya ilaç direncine sahip basiller ise kültürde üremeye devam edebilir. Ayrıca doğrudan yayma ve EZN boyaması ile incelemede ARB (-) olup, kültürde üreyebilme durumu da gözlenebilmektedir. Çünkü, doğrudan inceleme, kültürden daha az duyarlı bir yöntem olup, doğrudan yaymada aside dirençli basillerin görülebilmesi için, örneğin mililitresinde en az $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ basil olması gerekirken, kültürde pozitiflik yakalamak için örneğin mililitresinde 10-100 basil olması yeterlidir (Metchock et al., 1999; Dunlap et al., 2000).

Modifiye edilmiş Petroff yönteminde 1 balgam örneği için gerekli olan toplam işlenme süresi 45 dakikadır. İdrar örneklerinde ise süre 60 dakikadır. NaOH + NALC yöntemi temel alınarak hazırlanmış dekontaminasyon ve konsantrasyon kiti (Mycoprosafe – Salubris A.Ş) kullanılan işleme yönteminde 1 balgam örneği için gerekli olan toplam işlenme süresi 30 dakikadır. İdrar örneklerinde ise süre 40 dakikadır. Gerek uygulama kolaylığı gerekse zaman açısından bakıldığında Mycoprosafe kiti kullanımı zaman ve emek artırımı sağlamaktadır.

NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi için gerekli olan malzemelerin hazırlanması, modifiye edilmiş Petroff yöntemine göre daha zordur. Modifiye edilmiş Petroff yönteminde malzemelerin hazırlanması daha kolaydır. Bu yöntemde, steril edilmiş NaOH çözeltisi plastik şişelerde birkaç hafta saklanabilir, NaOH çözeltisi, HCl ve brom-timol mavisi ayıraç çözeltilerinin günlük hazırlanması gerekmez. HCl ve brom-timol mavisi ayıraç çözeltileri oda sıcaklığında saklanabilir. Fakat bu yöntem için gerekli çözeltiler büyük şişelerde hazırlandığından birden fazla hasta için kullanılmakta, bir örnekten diğerine mikobakteri aktarılmasına veya kendileri sıklıkla başka organizmalarla kontamine olarak tüm örneklerin kontaminasyonuna yol açabilmektedir. NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminde kullanılan NALC, oldukça etkili bir mukolitik madde olup, NaOH içeren çözeltide en fazla 24 saat içinde aktivitesini kaybeder. Bu nedenle çalışma çözeltisi, çalışmadan hemen önce hazırlanmalıdır. Yine bu yöntemde de

kullanılan çözeltiler büyük şişelerde hazırlandığı zaman bir örnekten diğerine mikobakteri aktarılmasına ve kontaminasyonlara yol açabilmektedir. Bu çözeltilerden özellikle fosfat tampon çözeltisi çabuk kontamine olabilmektedir ve klinik örneğe ekleme aşamasında sterilite koşullarına uyulmadığı ya da dikkatli olunmadığı takdirde çapraz kontaminasyon riskini arttırabilmektedir. Bu nedenle çözeltiler 1-2 klinik örneğe yetecek kadar küçük hacimlerde hazırlanmalıdır. Bu da laboratuvar iş yükünü ve malzeme ihtiyacını arttırmaktadır. Bundan dolayı Mycoprosafe kit kullanımı ile gerekli tüm malzemeler her örnek için ayrı şişelerde steril olarak alınmakta, bu durum çapraz ve genel kontaminasyonu engellemekte, önemli bir zaman ve emek artırımı sağlanabilmektedir.

Çalışmamızda Modifiye Petroff işleme yöntemi ile işlenen olguların kültür sonuçlarına göre, Modifiye Petroff işleme yöntemi sonrası mikroskopla incelemenin değerlendirilmesinde; Duyarlılık (%77,4), Özgüllük (%84,6), Pozitif Kestirim Değeri (%89,8), Negatif Kestirim Değeri (%97,6) saptanmıştır. Mycoprosafe kiti kullanılan işleme yönteminde olguların kültür sonuçlarına göre Mycoprosafe kiti ile işleme yöntemi sonrası mikroskopla incelemenin değerlendirilmesinde; Duyarlılık (% 84,5), Özgüllük (%86,3), Pozitif Kestirim Değeri (%91,9), Negatif Kestirim Değeri (%97,5) saptanmıştır.

Bu çalışmada iki yöntemin maliyetleri arasında bir karşılaştırma yapılmamakla birlikte, Mycoprosafe için harcanacak küçük bir ek miktar olsa bile bu, kitin kullanımı ile tüberküloz tanısı kesinleşen daha fazla hasta olması, kültürde üreme, antitüberküloz ilaçlara duyarlılığın saptama sürelerinin kısılması, tedavinin bu hastalarda doğru yönlendirilmesi, böylece ilaç artırımı sağlanması, yan etkilerin azaltılması, hastaların hastaneden erken taburcu edilebilmesi ve en önemlisi bu hastaların tüberküloz basilini sağlıklı kişilere bulaştırmasının engellenmesinin getireceği önemli ekonomik ve sosyal kazancın yanında tartışılmayacak düzeyde küçük kalmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1) Aydın F., Deri Tüberkülozu, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu 11 – 12 Haziran 2003, II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu 13 – 14 Haziran 2003, 1. Basım, Samsun 2003, ss: 123 – 129.
- 2) Aygen B, Ekstrapulmoner Tüberküloz In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds), İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Cilt 1, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul 2002, ss: 591 – 599.
- 3) Aygen B., Doğanay M. Ekstrapulmoner tüberküloz In: Wilke Topçu A., Söyletir G., Doğanay M. (eds), Enfeksiyon Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul 1996, ss: 448 – 454.
- 4) Aslan G. Genitoüriner Sistem Tüberkülozu, 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Bildiri Kitabı, ss: 165 – 172, 9 – 11 Aralık 2004, Çeşme, İzmir.
- 5) Bannister AB, Tegg TN, Gillespie SH. Infectious Diesase. Blackwell Science Ltd. 1996 ss: 342-366
- 6) Baron EJ, Peterson LR, Finegolo SM. Mycobacteria m: Shanahan (eds) Bailey 8 Scott's Diagnostic Microbiology (9 th ed). Mosby-Year Book, 1994 pp: 590-633
- 7) Baylan.O. Tüberküloz Tanısında Kullanılan Kültüre Dayalı Yöntemler. 5. Ulusal Mikobakteri sempozyum bildiri kitabı, ss. 65-72, 9-11 Aralık 2004 İZMİR
- 8) Bektaş A. Gastrointestinal Sistem ve Periton Tüberkulozu 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu 11 –12 Haziran 2003, II. Tüberküloz

Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu 13 – 14 Haziran 2003, I. Basım, Samsun 2003, ss: 135 – 140.

- 9) Bilgehan H. Mycobacteriumlar (2nd ed.), Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, İzmir 1995, ss: 567 – 578.
- 10) Bilgehan H. Mycobacteriumlar (3 th ed). Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir 2002 ss: 571-593
- 11) Bilgiç H., Türkiye’de Tüberkülozun Durumu ve Eradikasyon programı 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu 11 –12 Haziran 2003, II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu 13 – 14 Haziran 2003, I. Basım, Samsun, 2003 ss: 18 – 33.
- 12) Bilir M, Mert A, Özaras R, Tahan V, Tabak F, Öztürk R, Özbay G, Şentürk H, Aktuğlu Y. Lokalize Hepatik Tüberküloz, Bir olgu sunumu ve Litaratür Derlemesi, Klimik dergisi, 13 (1), 2000, ss: 30 – 32
- 13) Brooks GF., Butel JS., Morse SA., Mycobacteria In: Jawetz, Melnick 8 Adelberg’s Medical Microbiology (22 nd ed), Appleton, Lange A. Simon, Schuster Company 2001, pp: 275 – 284.
- 14) Catonzara A, Davidson BL, Fujiwara PL, et al. Rapid Diagnostic tests for tuberculosis what is the appropriate use! AM. J. Respir. Crit. Care Med. 1997; 155 : 1804-1814
- 15) Chadwick MV. Mycobacteria. Wright. PSG Bristol London Boston, 1982, pp 1-113
- 16) Croftan J., Horne N., Miller F. Klinik Tüberküloz, Çevirenler; Koçyiğit E., Dağlı E., Yüce Yayım 2. Baskı 2002, ss 1 – 222.

- 17) Çalışır HC, Şipit T, Öğretensoy M. Tüberküloz Tanı ve Tedavisi, Tüberküloz ve Toraks Dergisi 1998; 46 (1) : 81-99
- 18) Damle AS, Kaundinya DV. Comparison of three methods of decontamination of sputum for myobacterial culture. Indian Journal of Tuberculosis Official Organ of the Tuberculosis Association of India 1986; 33(3): 125-128
- 19) Della-Latta P, Weitzman I. Mycobacteriology in: Isenberg HD (ed), Essential Procedures for Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC 1998, pp: 169-203.
- 20) Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, et al. American Thoracic Society and the Centers For Disease Control and Prevention, Diagnostic Standarts and classification of tuberculosis in adults and children. Am. J. Respir. & Crit. Care. Med. 2000, 161; 1376-1395
- 21) Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, Dunbar DF. *Mycobacterium tuberculosis* and other nontuberculosis Mycobacteria in : Mahon CR, Manuselis G (eds), Textbook of Diagnostic Microbiolgy .Wb Saunders, Philadelphia 1995, pp: 635-673
- 22) Esteban J, Molleja A, Fernandez-Roblas R, Sorian of. Number of days required for recovery of Myobacteria from bload and other samples, J. Clin. Microbiol. 1998, 36 (5); 1456-1457
- 23) Freedman AG., Martin JM., Riska PF., Bloom BR., Casa de Vall A., Monoclonal Antibodies to surface antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their use in a Modified Enzyme – Linked Immune sorbent spot Assay for detection of Mycobacteria, J. Clin. Microbiol. 1996, 34 (11): 2795 – 2802.

- 24) Frothingham R, Strickland PL, Bretzel G et all. Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from west Africa. J. Clin Microbiol 1999; 37: 1921
- 25) Gaylord H, Brennan PJ, Leprosy and Leprosy bacillus: Recent developments in characterization of antigens and immunology of the disease. Ann Rev Microbiol. 41:645-675, 1987
- 26) Gedikoğlu S, Mycobacterium In : Kılıçturgay K. (ed), Klinik Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, 1994, ss: 65-81
- 27) Gedikoğlu S. *Mycobacterium tuberculosis*'in hücre yapısı, Enfeksiyon Dergisi 1997 (ek yayın – suppl); 11 (4): 13 – 18.
- 28) Haas DW, Prez RM. *Mycobacterium tuberculosis* In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds.), Principles and Practice of Infectious Diseases (4 th ed). Vol. 2. Churchill Livingstone Inc, Washington DC 1995, pp: 2213 – 2243.
- 29) Haas DW. Mycobacterial diseases. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone 2000, pp: 2576
- 30) Harries AD., Maher D. TB/HIV, A. Clinical Manual, Word Health Organization, 1996, pp: 19 – 101.
- 31) Hopewell PC., Bloom BR. Tuberculosis and other mycobacterial diseases In: Murrey JF., Nadel JA. (eds), Textbook of Respiratory Medicine (3 th ed). vol 1. Philadelphia: WB. Saunders Company 2000, pp: 1043 – 1105.
- 32) Iseman MD. Klinisyenler için Tüberküloz Kılavuzu Çeviren Özkara, Ş. Nobel Tıp Kitabevleri. 2002 ss: 1-464

- 33) Isenberg H.D, Clinical Microbiolgy Procedures Handbook, vol 1, Washihgton DC, 1992
- 34) Julian A., Matas L., Ausina V., Laquin M., Detection of lipoarabinomannan antibodies in patients with newly acquired tuberculosis and patients with relapse tuberculosis, J. Clin. Microbiol. 1997; 35 (10): 2663 – 2664.
- 35) Kayser FH, Bienz AK, Ecmert J, Zinkernagel RM. Tıbbi Mikrobiyoloji. Çevirenler Küçüker Anđ M, Tümbay E, Anđ Ö, Erturaz, Nobel Tıp Kitapevleri, 2002 . ss 256-267.
- 36) Kılıçaslan Z. Akciğer Tüberkülozu ve Atipik Mikobakteri İnfeksiyonları ın: Arseven O., Erkan F., Kılıçaslan Z (eds) Akciğer Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002, ss: 283 – 301.
- 37) Kılıçaslan Z. Dünyada Tüberküloz Kontrolü; Türkiye’de Durum, 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Bildirim Kitabı, ss: 69 – 78, 31 Ekim – 2 Kasım, Abant, 2002, ss: 69 – 78
- 38) Kılınç O., Tüberkülin Deri Testi (TDT), Yorumu ve Son Gelişmeler, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu 11 – 12 Haziran 2003, II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu 13 –1 4 Haziran 2003 Kitabı, 1. Basım, Samsun 2003, ss: 203 – 207.
- 39) Kıyan M. Mycobacteriaceae In: Ustaçelebi Ş. (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi Ltd., Ankara 1999, ss: 419-455
- 40) Kocabaş A, Bronş, akciğer, plevra ve mediasten infeksiyonları In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds), İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt:1, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul 2002, ss 539-591.

- 41) Kocabaş A, Mikobakterilerin Yapısal ve Antijenik Özellikleri İn : Kocabaş A (eds), Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü, Çukurova Üniversitesi Basımevi, Adana 1991, ss: 47-55
- 42) Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Mycobacteria In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (5 th ed), J.B. Lippincott Company 1997, pp: 893-95.
- 43) Köksal F, Yaman A, Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu 11 - 12 Haziran 2003, II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu 13 – 14 Haziran 2003, 1. basım Samsun, 2003, ss: 34-47.
- 44) Kundakçı N, Taşpınar A. Lepre ve Diğer Mikobakteriyel Deri İnfeksiyonları İn.: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds) İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, 1996, ss 803 – 816.
- 45) Lee LH, Levea Cm, Graman PS. Congenital tuberculosis in aneonatal intensive cara unit: Case report, epidemiological investigation and management of exposures. Clin infect dis 1998;27:474-477
- 46) Lefford JM Mycobacteria in : Rose NR, Barron AL (eds), Microbiology Basic Principles and Clinical Applications, Macmillan Publishing Company, 1983, pp: 223-233
- 47) Leitch AG. Pulmonary tuberculosis: Clinical features İn: Seaton A., Seaton D., Leitch AG. (eds), Crafton and Dauglas's Respiratory Diseases (5th ed.) vol.1, London: Beckwell Science, 2000 ss: 507 – 527.
- 48) Leitch AG. Tuberculosis: Pathogenesis, epidemiology and prevention İn: Seaton A., Seaton D., Leitch AG. (eds), Crafton and Douglas's

Respiratory Diseases (5 th ed.) vol: 1 London: Beckwell Science, 2000
pp: 476 – 506.

- 49) Leung AN. Pulmonary Tuberculosis: The Essentials Radiology 1999, 210: 307-322
- 50) Luelmo F, What is the role of sputum microscopy in patients attending health facilities?, In : Frieden (ed). Toman's Tuberculosis case detection, treatment and monitoring-questions and answers (2nd ed). WHO/HTM/TB/2004.334 Geneva. World Health Organization. 2004
- 51) Maes R. Clinical usefulness of serological measurements obtained by Antigen 60 in Mycobacterial Infections: Developent of a New Concept, Klin Wachenschr 1991, 69: 696 – 709.
- 52) Mehra V., Gang J., Iyer D., Lin YG., Boylen T., Bloon BR., Bares PF. Immune response to Recombinant Mycobacterial Proteins in Patients with tuberculosis infection and disease, J. Infect. Dis. 1996; 174: 431 – 434.
- 53) Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ, Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds), Manual of Clinical Microbiology (7 th ed.). American Societiy for Microbiology, Washington DC 1999, pp: 339-437.
- 54) Niksarlıoğlu Özgün Y., Çöplü L., Tüberküloz Plörezi, 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu 11 – 12 Haziran 2003, II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu 13 – 14 Haziran 2003, 1. Basım, Samsun 2003, ss 119 – 122.
- 55) Örne IM., Andersen P., Boom WH. T cell Response to *Mycobacterium tuberculosis*, J. Infect Dis 1993; 167: 1481 – 97.

- 56) Özakın C. Tüberkülozda kullanılan Yeni Yöntemler. 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Bildiri Kitabı 31 Ekim-2 Kasım 2002, Abant. ss. 49-56
- 57) Özerol Hİ., Tüberkülozun Serolojik Tanısı 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu 11 –12 Haziran 2003, II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu 13-14 Haziran 2003, 1. Basım, Samsun 2003, ss: 411-427.
- 58) Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H, Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı, T.C Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı, Ankara 2003
- 59) Özkara Ş. Klinisyen ve Laboratuvar işbirliğinde sorunlar. 5. Ulusal Mikobakteri sempozyum bildiri kitabı, 9-11 Aralık 2004 İzmir. ss.191-197
- 60) Öztürk N. Klinik Materyalin Hastadan Alınması ve laboratuvara gönderilmesi 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu 11-12 Haziran 2003, II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu 13-14 Haziran 2003, I. Basım, Samsun 2003 ss. 278-284
- 61) Rieder HL, Chonde TM, Myking H, Urbanczik R, Laszlo A, Kim JS, Deun AV, Trebucg A. The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network Minimum Requirements, Role and Operation in a Low-Income country. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) , pp: 1-110, 1998.
- 62) Rieder HL, Snider DE, Cauthen GM. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. Am. Rev. Respir. Dis. 1999: 141, 347-351

- 63) Richmond JY, Mckinney RW, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (4 th ed) Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health Washington 1999.
- 64) Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. Mycobacterium In: Balows A, Hausler JR, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds), Manual of Clinical Microbiology (5th ed), American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1991, pp: 304-339.
- 65) Saniç A, Çoban AY. Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun 1999, ss: 1-88.
- 66) Sarıgözel N. Direk Mikroskopi Teknikleri ve Değerlendirilmesi, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu 11-12 Haziran 2003, II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu 13-14 Haziran 2003, I.Basım, Samsun 2003, ss 291-299
- 67) Sevinç C. Mikobakterilerde Virulansın Kliniğe Yansıması, 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Bildiri Kitabı, 9 – 11 Aralık 2004, İzmir. ss: 125 – 133,
- 68) Sultan N. Mycobacterium tuberculosis'in virulans faktörleri, 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Bildiri Kitabı, 21 – 22 Nisan 1999, TÜBİTAK Feza Gürsoy Salonu, Ankara. ss: 10 –19.
- 69) Sürücüoğlu S. Tüberküloz Tanısında Kullanılan Serolojik ve Diğer Yöntemler, 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Bildiri Kitabı, 9 – 11 aralık 2004. İzmir. ss: 73 – 78.
- 70) Umut S., Yıldırım N., Tüberküloz ın: Erk M. (eds) Göğüs Hastalıkları cilt:1, İstanbul Üniversitesi Yayınları: 4297, 2001, ss: 485 – 547.

- 71) Unat EK. Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi. Dergah Tıp Yayınları. 1. Baskı, 1982. ss: 312-388
- 72) Uzun M. Örneklerin işlenmesi ve Kültür Yöntemleri 21. Yüzyılda Tüberküloz sempozyumu 11-12 Haziran 2003, II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu 13-14 Haziran 2003, I. Basım Samsun 2003, ss: 285-290
- 73) Wayne LG, Kubica GP, Mycobacteria In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2 Williams and Wilkins, Baltimore 1986, pp: 1435-1457.
- 74) World Health Organization: Laboratory Services in Tuberculosis Control. Part II : culture Global Tuberculosis Programme, WHO/TB/98.258 Geneva : World Health Organization, 1998
- 75) Yüce A. Kemik ve Eklem Tüberkülozu. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Bildiri Kitabı, 9 – 11 Aralık 2004, İzmir, ss: 160 – 164

Genelağ (İnternet) Sayfaları

- 1) <http://rhsm.saglik.gov.tr/bolumler>, 2005
- 2) <http://www.salubrisinc.com/medicaproductline.html>, 2005
- 3) <http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/bacteria.genus.mycobacterium.html>, 2005
- 4) <http://www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>, 2005
- 5) <http://www.goshen.edu/bio/Biol206/Biol206LabProject/tricia/tbbio.html>, 2005

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Ankara’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 1994 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yüksek öğrenimine başladı. 1998 yılında biyolog olarak mezun oldu. 1999 yılında T.C Sağlık Bakanlığı İstanbul Süreyyapaşa Göğüs Kalp ve Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesinde göreve başladı ve halen görevini sürdürmektedir.