V. TÜBERKÜLOZ SEMPOZYUMU VE VI. TÜBERKÜLOZ LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ UYGULAMALI KURSU KİTABI

18-21 EKİM 2007

www.klimik.org.tr

ANKARA

İÇİNDEKİLER

Düzenleme kurulu.....04

Önsöz.....05

Sempozyum Programı.....06

Kuramsal Program.....08

Kurs Programı.....09

Uygulamalı Eğitim Konuları ve Grupları.....10

Uygulamalı Eğitim Rotasyon Programı.....11

Sempozyum.....13

Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz.....15
(Şeref Özkara)

Konak Duyarlılığını Arttıran Genetik Özellikler.....21
(Ayşe YÜCE)

Latent Tüberküloz Tanısında Kullanılan Yeni Yöntemler.....22
(Mustafa BAKIR)

Latent Tüberküloz Enfeksiyonu Tedavisi.....27
(Haluk C. ÇALIŞIR)

Türkiye ve Dünyada Tüberkülozun Moleküler Epidemiyolojisi.....33
(Rıza DURMAZ)

Moleküler Epidemiyolojik Yöntemlerin Tüberkülozda Kullanım Amaçları.....43
(Alpaslan ALP)

Genotiplendirmede Kullanılan Yöntemler.....49
(Cengiz Çavuşoğlu)

Mikobakteriyoloji Laboratuvarında Kalite ve İç Kalite Denetimi.....57
(Tanıl Kocagöz)

Akreditasyon ve Dış Kalite Kontrol Uygulamaları.....64
(Nuran ESEN)

İÇİNDEKİLER

Sağlık Çalışanlarında Tüberküloz Riski ve Korunma Önlemleri 74
(Mustafa ÖZYURT)

Laboratuvarda Alınması Gerekli Güvenlik Önlemleri 100
(İsmail Ceyhan)

Etkinliği Araştırılan Yeni İlaçlar.....112
(Vildan AVKAN OĞUZ)

Tüberküloz Aşıları 119
(Seyyal ROTA)

Tüberküloz ve Gelecek.....126
(Feyzullah GÜMÜŞLÜ)

Uygulamalı Kurs Konuları 128

Tüberküloz Laboratuvarında Çalışma Prensipleri 130

Klinik materyalin hastadan alınması ve laboratuvara gönderilmesi.....132
(Meltem UZUN)

Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri 137
(Meltem UZUN)

Direk mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi 143
(Nevin SARIGÜZEL SAR)

Auramine-Rhodamine floresan boyama.....150
(Vildan AVKAN OĞUZ)

Tüberküloz basilinin klasik yöntemlerle identifikasyonu 155
(Süheyla SÜRÜCÜOĞLU)

Antibiyotik duyarlılık test yöntemleri.....168
(Nuri ÖZKÜTÜK)

Tüberküloz tanısında klasik pcr.....194
"PCR ve RFLP Yöntemleri ile Mycobacterium Türlerinin İdentifikasyonu"
(Ahmet SANİÇ, Ahmet KİZİRGİL)

Tüberkülozun moleküler tanısında ticari sistemler.....206
"İzotermal Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu Tekniğinin Kullanımı"
Strand Displacement Amplification (SDA)
(Mustafa ÖZYURT)

KURS DÜZENLEME KURULU

SEMPOZYUM ve KURS BAŞKANI

Prof. Dr. Ayşe YÜCE
Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu Başkanı

DÜZENLEME KOMİTESİ

Ayşe YÜCE	(BAŞKAN)
İsmail CEYHAN	(YEREL KOORDİNATÖR)
Süheyla SÜRÜCÜOĞLU	(SEKRETER)
Meltem UZUN	(ÜYE)
Mustafa ÖZYURT	(ÜYE)
Nevin SARIGÜZEL SAR	(ÜYE)

ÖNSÖZ

Değerli Meslektaşlarımız,

Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu olarak düzenlediğimiz "V. Tüberküloz Sempozyumu ve VI. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu"nda sizlerle Ankara'da bir arada olmanın mutluluğunu yaşıyoruz.

Her geçen gün tanı ve sağaltımına yönelik önemli gelişmeler kaydedilmiş olmasına karşın dünyanın en önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam eden tüberkülozun eradikasyon ve kontrolünde erken tanı, doğru sağaltım ve izlemin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Ancak ülkemizde ve dünyada tüberkülozun sağaltım ve izleminde olduğu kadar pek çok mikrobiyoloji laboratuvarında standardizasyon sorunları bulunmaktadır. Bu sempozyum ve kursun ana hedefi; konunun uzmanları ile tüberküloz alanındaki son gelişmeleri tartışmak, bilgi ve deneyimlerimizi paylaşmak, yaşadığımız sorunlara çözümler bulmak ve ülkemizde tanı yöntemlerinde bir standardizasyonun sağlanmasına katkıda bulunmaktır. Sempozyum kapsamında bir konferans ve beş oturum yapılacaktır. Kurs için önceden olduğu gibi 16 katılımcı için 10 kişilik eğitici grubu görev yapacaktır. Her bir kursiyere tüm testlerin bizzat yaptırıldığı uygulamalı kurslara bugüne değin öğretim üyesi, araştırma görevlisi ve dispanser hekimi olmak üzere 82 meslektaşımız katılmıştır.

Sempozyum ve kursun ev sahipliğini yapan Sayın Uzm. Dr. İsmail Ceyhan ve çalışma arkadaşları ile katılarak bize güç veren tüm değerli meslektaşlarımıza teşekkür eder, saygılar sunarız.

Prof. Dr. Ayşe YÜCE
Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu Başkanı

V.TÜBERKÜLOZ SEMPOZYUMU PROGRAMI
19 Ekim 2007

9.00-9.15	**AÇILIŞ TÖRENİ**
9.15-10.00	**KONFERANS** **Oturum Başkanları: Ayşe YÜCE, Ahmet SANİÇ**
	Tüberkülozun dünyadaki ve ülkemizdeki durumu **Şeref ÖZKARA**
10.00-10.30	**KAHVE ARASI**
I.OTURUM	**PPD ve LATENT TÜBERKÜLOZ** **Oturum Başkanları: Hayati BİLGİÇ, Eyüp Sabri UÇAN**
10.30–10.50	Konak duyarlılığını artıran genetik özellikler **Ayşe YÜCE**
10.50-11.10	PPD ve değerlendirme kriterleri: Halen geçerli mi, değişmeli mi? **Eyüp Sabri UÇAN**
11.10-11.30	Latent tüberküloz tanısında kullanılan yeni yöntemler **Mustafa BAKIR**
11.30-11.50	Latent tüberküloz sağaltımı **Haluk ÇALIŞIR**
12.00-12.30	**KAHVE ARASI**
II.OTURUM	**TÜBERKÜLOZUN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ** **Oturum Başkanları: Suna GEDİKOĞLU, Gülşen HASÇELİK**
12.30-12.50	Ülkemizde ve dünyada tüberkülozun moleküler epidemiyolojisi **Rıza DURMAZ**
12.50-13.10	Moleküler epidemiyolojik yöntemlerin tüberkülozda kullanım amaçları **Alpaslan ALP**
13.10-13.30	Genotiplendirmede kullanılan yöntemler **Cengiz ÇAVUŞOĞLU**

13.30-14.30	**ÖĞLE ARASI**
III. OTURUM	**TÜBERKÜLOZ LABORATUVARLARINDA KALİTE KONTROL UYGULAMALARI** **Oturum Başkanları: Meltem UZUN, Süheyla SÜRÜCÜOĞLU**
14.30-14.50	İç kalite kontrol uygulamaları **Tanıl KOCAGÖZ**
14.50-15.10	Dış kalite kontrol uygulamaları ve akreditasyon **Nuran ESEN**
15.10-15.30	Ülkemizdeki laboratuvarların güncel durumu: Tüberküloz Çalışma Grubu Anket Çalışması **Nevin SARIGÜZEL SAR**
15.30-16.00	**KAHVE ARASI**
IV. OTURUM	**TÜBERKÜLOZ KONTROLÜ: HEDEFLER ve MEVCUT VERİLER** **Oturum Başkanları: Kemal TAHAOĞLU, Zeki KILIÇASLAN**
16.00-16.20	Ulusal tüberküloz kontrol programı hedefleri ve DGT **Zeki KILIÇASLAN**
16.20- 16.40	Sağlık çalışanlarında tüberküloz riski ve korunma önlemleri **Mustafa ÖZYURT**
16.40-17.00	Laboratuvarda alınması gereken güvenlik önlemleri **İsmail CEYHAN**
17.00-17.30	**KAHVE ARASI**
V. OTURUM	**TÜBERKÜLOZDA YENİLİKLER** **Oturum Başkanları: Firdevs AKTAŞ, Feyzullah GÜMÜŞLÜ**
17.30-17.50	Etkinliği araştırılan yeni ilaçlar **Vildan AVKAN OĞUZ**
17.50-18.10	Yeni aşılar **Seyyal ROTA**
18.10-18.30	Tüberküloz ve gelecek **Feyzullah GÜMÜŞLÜ**
18.30-19.00	**SEMPOZYUM DEĞERLENDİRMESİ VE KAPANIŞ**
19.00-22.00	**KOKTEYL**

VI. TÜBERKÜLOZ LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ UYGULAMALI KURSU "KURAMSAL PROGRAM" 18 Ekim 2007

18 Ekim 2007 (Perşembe)	**KURAMSAL PROGRAM**
19 Ekim 2007 (Cuma)	**SEMPOZYUM**
20-21 Ekim 2007 (Cumartesi, Pazar)	**UYGULAMALI EĞİTİM**

I.OTURUM	**TÜBERKÜLOZ LABORATUVARI İŞLEMLERİ (I)**
14.30-15.10	Klinik materyalin hastadan alınması ve laboratuvara gönderilmesi, işlenmesi ve kültürü **Meltem UZUN**
15.10-15.30	Mikroskopik inceleme teknikleri ve değerlendirilmesi Ziehl-Neelsen boyanması **Nevin SARIGÜZEL SAR** Auramin-rodamin boyaması **Vildan AVKAN OĞUZ**
15.30-15.50	Tüberküloz basilinin identifikasyonu **Süheyla SÜRÜCÜOĞLU**
15.50-16.10	**KAHVE ARASI**

II.OTURUM	**TÜBERKÜLOZ LABORATUVARI İŞLEMLERİ (II)**
16.10-16.30	Antibiyotik duyarlılık test yöntemleri **Nuri ÖZKÜTÜK**
16.30-16.50	Tüberküloz tanısında PCR **Ahmet KİZİRGİL**
16.50-17.10	Moleküler tanıda ticari sistemler **Mustafa ÖZYURT**
17.10-17.30	**TARTIŞMA**
19.30	**AKŞAM YEMEĞİ**

VI.TÜBERKÜLOZ LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ UYGULAMALI KURS PROGRAMI

20 Ekim 2007

8.30-12.30	**Uygulamalı Eğitim**
12.30-13.30	**Öğle Arası**
13.30-17.30	**Uygulamalı Eğitim**
20.00	**Akşam Yemeği**

21 Ekim 2007

8.30-12.30	**Uygulamalı Eğitim**
12.30-13.30	**Öğle Arası**
13.30-17.30	**Uygulamalı Eğitim**
17.30-18.00	**KURS DEĞERLENDİRMESİ VE KAPANIŞ**

"UYGULAMALI EĞİTİM KONULARI VE GRUPLARI"

EĞİTİM GRUP-1 : Hasta örneklerinin işlenmesi ve kültürü

a. Hasta örneklerinin işlenmesi (Homojenizasyon, dekontaminasyon, konsantrasyon)

Eğitimci – Dilek ŞATANA

b. Kültür (LJ, Middlebrook, Bactec besiyerlerine inokulasyon, inkübasyon ve değerlendirme)

Eğitimci – Meltem UZUN

EĞİTİM GRUP-2 : Mikroskopik inceleme teknikleri ve değerlendirme

a. Asidorezistan boyama

Eğitimci – Nevin SARIGÜZEL SAR

b. Auramin-rodamin fluoresan boyama

Eğitimci – Vildan AVKAN OĞUZ

EĞİTİM GRUP-3 : Klasik identifikasyon yöntemleri

Üreme hızı, üreme ısısı, pigment yapımı, mikrokoloni, niasin birikimi, nitrat redüksiyonu, NAP testi, katalaz testi, TCH Testi

Eğitimci – Süheyla SÜRÜCÜOĞLU

EĞİTİM GRUP-4 : Antibiyotik duyarlılık test yöntemleri

LJ, Middlebrook 7H10, Bactec460, MGIT 960

Eğitimci – Nuri ÖZKÜTÜK, İsmail CEYHAN

EĞİTİM GRUP-5 : Tüberküloz tanısında PCR

Klasik PCR , RFLP

Eğitimciler - Ahmet SANİÇ, Ahmet KİZİRGİL

EĞİTİM GRUP-6: Moleküler tanıda ticari sistemler

İzotermal dizi yer değiştirme amplifikasyonu tekniğinin kullanımı "Strand Displacement Amplification (SDA)"

Eğitimci - Mustafa ÖZYURT

VI. TÜBERKÜLOZ LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ UYGULAMALI EĞİTİM ROTASYON PROGRAMI (20-21 EKİM 2007)

1.GÜN	SAAT	EĞİTİM GRUP-1	EĞİTİM GRUP-2	EĞİTİM GRUP-3	EĞİTİM GRUP-4	EĞİTİM GRUP-5	EĞİTİM GRUP-6
20 Ekim 2007	8.30-10.30	A	B	C	D	E F	G H
	10.30-12.30	D	A	B	C	E F	G H
	13.30-15.30	C	D	A	B	G H	E F
	15.30-17.30	B	C	D	A	G H	E F

2.GÜN	SAAT	EĞİTİM GRUP-1	EĞİTİM GRUP-2	EĞİTİM GRUP-3	EĞİTİM GRUP-4	EĞİTİM GRUP-5	EĞİTİM GRUP-6
21 Ekim 2007	8.30-10.30	E	F	G	H	A B	C D
	10.30-12.30	H	E	F	G	A B	C D
	13.30-15.30	G	H	E	F	C D	A B
	15.30-17.30	F	G	H	E	C D	A B

SEMPOZYUM

DÜNYADA VE TÜRKİYE'DE TÜBERKÜLOZ

Doç. Dr. Şeref Özkara
Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara

GİRİŞ

Tüberküloz dünyada en çok morbidite ve mortaliteye yol açan tek mikrobik hastalıktır. Basilin binlerce yıldır var olduğu bilinmektedir. Bu hastalıkla mücadelede epidemiyolojik bilgilerin büyük önemi vardır. Hem dünyada hem de ülkemizde veremle ilgili bilgilerimizin belki de bugüne kadar en iyi olduğu bir noktadayız. Bununla birlikte, bu verilerin ciddi hatalar içerdiği ortaya konulmuştur (1). Örneğin, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ'nün) 2006 TB Raporu'nun incelenmesi dikkate değer sonuçlar doğurmuştur. Toplam 211 ülkede 6,4 milyar nüfus ve 8,9 milyon TB hastası olduğu tahmini yapılmıştır. Bu tahminde 2,2 milyar kişinin yaşadığı 27 ülkede, 1,8 milyon TB hastası ile ilgili verilerin iyi olduğu görülmüştür; 2 milyar kişinin yaşadığı ve 3,1 milyon hastanın olduğu 154 ülkede ise verilerin kötü olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle dünyadaki hastaların %80'ini barındıran yüksek olgu yükü olan 22 ülkenin hiçbirinde iyi bir sürveyans sistemi yoktur (1). Ülkemizdeyse, 25 yıldır bir prevalans çalışması yapılmamıştır; BCG rutin uygulandığı için yıllık enfeksiyon riski hesabı yapılamamaktadır; verem savaşı dispanserlerinin verilerine dayanan iyi bir sürveyans sistemi var olmakla birlikte (2), dispanserlerde kaydı olmayan hastaların en az %15 olduğu tahmini yapılabilir.

DÜNYADA TÜBERKÜLOZ

DSÖ'nün yayımladığı "Küresel TB Raporu" Dünya'daki TB'un durumu ve değişimi konusunda önemli bilgi vermektedir (3). Bu bilgiler, kayıtlı hastalara ait olanlar ve DSÖ'nün yaptığı tahmini veriler olarak yer almaktadır. Bu raporda planlama, bütçe bilgileri bulunmakta ve yüksek olgu yükü olan 22 ülkenin herbiri ayrıntılı incelenmektedir.

2005 yılında tüm Dünyada tahmin edilen toplam hasta sayısı 8.811.000; insidans oranı yüzbin nüfusta 136; yayma pozitif hasta sayısı 3.902.000 ve insidansı yüzbin

nüfusta 60'dır. Kayıtlı tüm hastalar 5.126.159, yayma pozitif olanlar 2.412.784'dür. Yani kayıtlı hastaların tahmin edilenlere oranı tüm hastalarda %58, yayma pozitiflerde %62'dir (Tablo I).

Tablo I: 2005 yılında Dünya'da tahmin edilen TB olgu yükü (3)

		İnsidans				Prevalans		Mortalite		TB'lularda HIV prevalansı** %
		Bütün olgular		Yayma (+)		Bütün olgular		Bütün olgular		
	Nüfus X1000	Sayı X1000	100.000 nüfus/yıl	Sayı X1000	100.000 nüfus/yıl	Sayı X1000	100.000 nüfus/yıl	Sayı X1000	100.000 nüfus/yıl	
AFRİKA	738.083	2.529	343	1.088	147	3.773	511	544	74	28
AMERİKA	890.757	352	39	157	18	448	50	49	5,5	7,9
D.AKDENİZ	541.704	565	104	253	47	881	163	112	21	2,1
AVRUPA	882.395	445	50	199	23	525	60	66	7,4	4,6
G.D.ASYA	1.656.529	2.993	181	1.229	81	4.809	290	512	31	3,9
B.PASİFİK	1.752.283	1.927	110	866	49	3.616	206	295	17	1,0
22 ÜLKE*	4.045.482	7.033	174	3.117	77	11.546	285	1.265	31	10
TOPLAM	**6.461.751**	**8.811**	**136**	**3.902**	**60**	**14.052**	**217**	**1.577**	**24**	**11**

*22 ÜLKE, Dünya'daki TB hastalarının %80'inin bulunduğu, en çok TB hastası olan ülkelerin sayısı 22'dir ve bunlara "yüksek olgu yükü olan ülkeler" denilmektedir.

**15-49 yaş erişkin TB olgularında HIV prevalansı

Dünyada en çok hasta olan ülkeler, tahmin edilen hasta sayıları ile Hindistan (1.852.000), Çin (1.319.000), Endonezya, Nijerya, Bangladeş, Pakistan ve Güney Afrika'dır. Sahra Güneyindeki Afrika ülkelerinde hastalık insidansı en yüksektir, bunu Güneydoğu Asya izlemektedir. Afrika'da özellikle HIV ve TB birlikteliğinin olduğu ülkelerde yüzbinde 300'ü aşan insidanslar söz konusudur.

Ülkelerin birçok özelliğini ve yapılan ilaç duyarlılık testi (İDT) çalışmalarını dikkate alarak yapılan bir tahmin çalışmasında Dünya'da çok-ilaca dirençli TB (ÇİD-TB) hastalarının 425.000 olduğu tahmin edilmektedir (4). Yeni olgularda %2,6, tedavi görmüş olgularda %21,8, tüm olgularda %4,6 ÇİD-TB olduğu tahmin edilmektedir. Hasta sayısı fazla olduğu için Hindistan ve Çin'de en çok ÇİD-TB hastası bulunurken, eski Sovyetler Birliği ülkelerinde ÇİD-TB oranları çok yüksektir.

2006 yılında Dünya'da **yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD-TB)** [İngilizce: "extensively drug resistant TB" (XDR-TB)] kavramı ortaya çıkmıştır. ÇİD-TB varlığına ek olarak ikinci grup TB ilaçlarından bir kinolon ve parenteral ilaca direnç olmasına YİD-TB denilmektedir. Bu hastalardan ancak dörtte birinde tedavi başarılı olabilmektedir ve ölüm oranı çok yüksektir (5).

DSÖ, önce 2000 yılı için, sonra da 2005 yılı için "tahmin edilen olguların %70'ini bulmak ve bu olguların %85'ini başarıyla tedavi etmek" hedefini ortaya koymuştu. 2005'te Dünya'da olgu bulma %60 ve tedavi başarısı %84 düzeyinde

gerçekleşmiştir (6). Bu hedeflere ulaşma çabası sürdürülürken, **Milenyum Gelişme Hedefleri** ortaya konulmuştur. Buna göre 1990 yılına göre 2015 yılında TB prevalans ve ölümlerde %50 düşüş, insidans oranında da 2015'de artışın durdurulup düşüşün başlaması amaçlanmaktadır (7).

Dünyada TB kontrolü ile ilgili Yeni **Stop TB Stratejisi** (8) ve **Stop TB Küresel Planı 2006-2015** (9) önemli gelişmelerdir. Stop TB Stratejisi, TB kontrolünün bakış açısını genişletmiştir. TB kontrol çabalarının hasta odaklı olması ve herkesin bu hizmete ulaşabilmesi gereklidir. Bu çerçevede, (a) yüksek kalitede DGTS'nin yaygınlaştırılması ve güçlendirilmesi, (b) TB/HIV ve ÇİD-TB'yi kapsaması, (c) Sağlık sistemini güçlendirici yaklaşımlar, (d) kamu, özel ve diğer bütün tarafların rol alması, (e) TB hastalarının güçlendirilmesi, katılımı, kamuoyu oluşturma, toplumsal seferberlik, (f) araştırmayı destekleme ve kolaylaştırma unsurlarını taşımaktadır.

TÜRKİYE'DE TÜBERKÜLOZ

Sağlık Bakanlığı'nın 24 Mart 2007 Dünya TB Gününde yayımladığı "Türkiye'de Verem Savaşı, 2007 Raporu" dispanserlere kayıtlı hastaların bilgilerini sunmaktadır. Son 10 yılın verileri tablolar ile sunulurken, 2005 yılı hastaları ile başlatılmış olan bireysel veri toplamanın analiz edilmiş sonuçları sunulmuştur (8). Tablo II, III, IV'de bazı temel veriler sunulmuştur.

Tablo II: 2005 yılında verem savaşı dispanserlerine kayıtlı hastaların özellikleri (2)

	Sayı	**Yüzde**
Akciğer TB hastaları	14.987	(73,0)
Yayma pozitif akciğer TB hastaları	8.505	(56,8)
Yayma negatif akciğer TB hastaları	3.361	(22,4)
Yayma bakılmamış akciğer TB hastaları	3.121	(20,8)
Akciğer dışı TB hastaları	5.548	(27,0)
TÜM TB HASTALARI	**20.535**	
Yeni olgular	18.753	(91,3)
Tedavi görmüş olgular	1.782	(8,7)

Tablo III. Türkiye'de 2005 yılında dispanserlere kayıtlı akciğer TB hastalarında mikroskopi ve kültür bilgileri (2)

	Akciğer TB	Yapılan (yüzde)	Pozitif (yüzde)	Negatif (yüzde)	Yapılmadı (yüzde)
Mikroskopi	14.987	11.866 (79,2)	8.505 (56,8)	3.361 (22,4)	3.121 (20,8)
Kültür	14.987	6.971 (46,5)	5.708 (38,1)	1.263 (8,4)	8.016 (53,5)

Tablo IV. Türkiye'de 2005 yılında dispanserlere kayıtlı TB hastalarından ilaç duyarlılık testi (İDT) çalışılanlarda her bir ilaç için toplam direnç sonuçları (2).

	Yeni hasta (n=3.237)		Tedavi görmüş hasta (n=508)		Tüm hastalar (n= 3.745)	
	Dirençli	Oran	Dirençli	Oran	Dirençli	Oran
İzoniyazid	291	9,0	139	27,4	430	11,5
Rifampisin	144	4,4	107	21,1	251	6,7
Etambutol*	97	3,0	51	10,0	148	4,0
Streptomisin*	227	7,0	77	15,2	304	8,1
ÇİD	101	3,1	90	17,7	191	5,1

* Etambutol için 3 yeni, 1 tedavi görmüş hastanın, streptomisin için 1 yeni, 1 tedavi görmüş hastanın İDT sonucu bulunmamaktadır.

Akciğer TB olgularından (14.987), kültür yapılanlar [6.971 (%46,5)], kültür pozitif bulunanlar [5.708 (%38,1)]'dir. İlaç duyarlılık testi (İDT) çalışılan 3.745 hastadan ÇİD-TB 191 (%5,1) olguda saptanmıştır.

Akciğer dışı TB (AD-TB) olgularının en sık görülenleri, plevra (2.274, %37,4), toraks dışı lenfadenit (1.622, %26,7), toraks içi lenfadenit (335, %5,5)'tir; bunu gastrointestinal sistem/periton, genitoüriner sistem, vertebra dışı kemik/eklem, vertebra, menenjit, milier ve menenjit dışı santral sinir sistemi TB izlemiştir. AD-TB olgularında mikroskopik ve kültür tanı oranları düşüktür.

Her bir il tek tek incelendiğinde, bakteriyolojik tetkik yapılma ve pozitiflik oranları ile AC-TB ve AD-TB oranları, erkek/kadın oranları büyük farklılıklar göstermektedir. Bu bilgiler her bir ilde verem savaşı hizmetlerinin geliştirilmesinde büyük bir önem taşımaktadır.

Hastalık olgu hızının yaş gruplarına göre dağılımı Şekil 1'de görülmektedir.

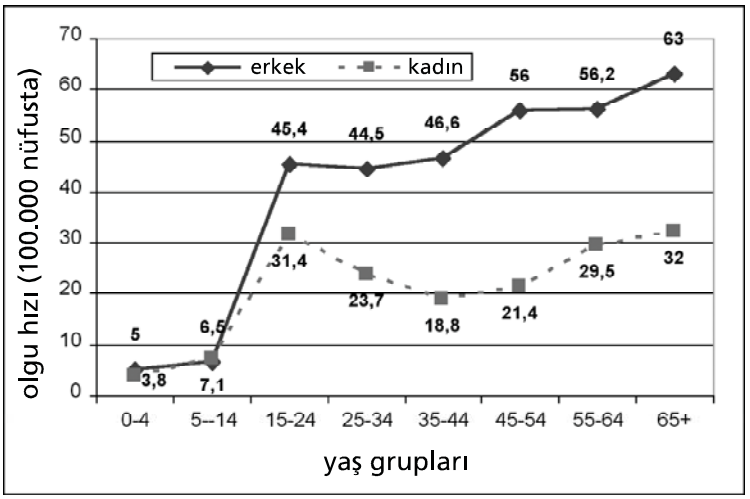
Ülkemizde TB hastalarında tedavi başarısı son 15 yılda giderek artmaktadır.

1999 yılında tedaviyi terk eden yeni olguların oranı %12, önceden tedavi görmüş olguların oranı ise %23 idi (10). Son yıllarda tedaviyi terk oranları yeni hastalarda %5'in altındadır (yayımlanmamış veri). Basil pozitif hastalardaki bakteriyolojik iyileşmeyi gösteren kür oranları da giderek artmaktadır fakat hâlâ düzeyi hala istenen noktada değildir.

Türkiye'de verem savaşı dispanserlerin önemli görevleri vardır; bunlar: TB hasta tanısı, tedavinin başlanması, ücretsiz ilaç temini, DGT ile tedavinin sürdürülmesi ve sonlandırılması, kayıt ve bilgilerin raporlanması, hasta temaslılarının ve diğer risk gruplarının taranması, koruyucu ilaç tedavisinin uygulanması (11). Deneyimli bir ekibin verem savaşında yer alması önemlidir, bunu da dispanserler sağlamaktadır. Bu nedenle, Sağlıkta Dönüşüm Programında verem savaşı dispanserlerinin varlığını sürdürmesi büyük değer taşımaktadır.

Ülkemizde bakteriyolojik inceleme (mikroskopi, kültür ve İDT) konusunda son yıllarda hızlanan bir gelişme vardır. Bununla birlikte birçok büyük ilimizde TB laboratuvarı yoktur; mikroskopi yapılamayan milyonluk kentlerimiz vardır. Üniversitelerinde TB konusunda karmaşık moleküler yöntemlerin uygulandığı birçok büyük ilimizde iyi işleyen rutin laboratuvarlar yoktur. Laboratuvarlarımızda bir kalite kontrol sisteminin de yeni yeni başlatıldığını görüyoruz. Mutlaka TB bakteriyolojisinde her şüphelenilen kişiden mikroskopi ile kültür ve kültürde her üreyen basilde İDT yapılmalıdır. ÇİD-TB saptanan her hastada ikinci grup ilaçlara İDT yapılmalıdır. Bütün laboratuvarların kalite kontrolü rutin yapılabilmelidir.

Şekil 1: 2005 yılında verem savaşı dispanserlerine kayıtlı tüm hastaların yaş gruplarına ve cinsiyete göre olgu hızı eğrileri (2).



ÇİD-TB ve kronik hastaların ikinci grup ilaçlarla tedavisi ülkemizde 15 yıldır sürdürülmektedir. Bu uygulamada, İDT sonuçlarının geç gelmesi ve klinisyenlerin İDT sonuçlarına tam güvenememeleri önemli bir sorun oluşturmaktadır (12).

Tüberküloz kontrolünün en önemli ayaklarından birisi bakteriyoloji laboratuvarıdır. "Neden balgam incelemesi yapmadınız?" sorusunu sormak yerine, "Neden herkesin ulaşabileceği kaliteli TB laboratuvarınız yok?" sorusunu sormalıyız.

KAYNAKLAR

1. van der Werf MJ, Bordorff MW. Targets for tuberculosis control: how confident can we be about the data? Bull WHO 2007; 85:370-376.
2. Gümüşlü F, Özkara Ş, Özkan S, Baykal F, Güllü Ü. Türkiye'de Verem Savaşı, 2007 Raporu. Verem Savaşı Daire Başkanlığı, Ankara 2007.
3. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
4. Zignol M, Hosseini MS, Wright A, et al. Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. J Infect Dis 2006; 194:479-85.
5. Özkara Ş. Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD-TB). Solunum Hastalıkları 2007; 18:88-92.
6. Dye C, Hosseini M, Watt C. Did we reach the 2005 targets for tuberculosis control? Bulletin of the WHO. 2007; 85: 364-369.
7. The Millenium Development Goals Report 2006. New York: United Nations; 2006.
8. The Stop TB Strategy. Geneva. WHO, 2006 (WHO/HTM/TB/2006.368).
9. The Global Plan to Stop TB, 2006-2015. Geneva. World Health Organization. 2006 (WHO/HTM/STB/2006.35).
10. Özkara Ş, Kılıçaslan Z, Öztürk F, et al. Bölge verileriyle Türkiye'de tüberküloz. Toraks Dergisi, 2002; 3: 178-187.
11. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Ankara, 2003. Tahaoğlu K, Törün T, Sevim T, et al. The treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Turkey. New Engl J Med 2001; 345: 170-4.

KONAK DUYARLILIĞINI ARTTIRAN GENETİK ÖZELLİKLER

Prof. Dr. Ayşe YÜCE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakteriyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Konaktaki genetik değişikliklerin; birçok mikroorganizmalar tarafından oluşturulan enfeksiyon hastalıklarının seyri üzerine çok önemli etkileri olduğu açıktır. Örneğin lepranın bir aile içi hastalığı olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. İmmun olmayan kişilerde sifiliz için yapılan malarya tedavisinin ya da Lübeck'te yaşanan BCG aşısı ile ilgili facianın sonuçları bu patojenlere karşı çeşitli derecede duyarlılıklar olduğunu direkt olarak kanıtlamışlardır. Bu gözlemsel verilere ek olarak ikizlerde ve evlat edinilen kişilerde yapılan çalışmalarda konak genetik faktörlerinin enfeksiyon hastalıklarına duyarlılıkları konusunda önemli olduğunu göstermiştir. Monozigot ikizlerde genetik paylaşım %100 olduğu için aynı hastalıkların görülme riski çok daha fazladır. Örneğin Almanya'da yapılan bir çalışmada tüberküloz için monozigot ikizlerde uyum 65 iken, bu oran dizigotlarda 25 bulunmuştur. Enfeksiyonlara karşı gerek kazanılmış gerekse doğal dirençte rol oynadığı bilinen gen çeşitleri ve bunların fonksiyonlarının değerlendirildiği pek çok çalışma vardır. Çeşitli hastalıklara direnç ya da yatkınlık oluşturan gen varyantları Tablo 1 de özetlenmiştir.

Tablo 1: Bazı bakteriyel enfeksiyonlara direnç ya da duyarlılıktan sorumlu genler

Gen	**Varyant**	**Hastalık**	**Etki**
HLA-DR	HLA-DR2	Tüberküloz	Duyarlılık
NRAMP 1	5` ve 3` Varyantları	Tüberküloz	Duyarlılık
Vitamin D reseptör	3` Varyant	Tüberküloz	Direnç
İnterferon gama	İntron varyant	Tüberküloz	Direnç
İnterferon gama	Çeşitli Mutasyonlar	Dissemine BCG Enfeksiyonu	Duyarlılık

HLA-DR, NRAMP 1 genleri tüberküloza duyarlılığı arttırırken, vitamin D reseptörleri ve IFN gamanın dirençte etkili olduğu görülmektedir.

LATENT TÜBERKÜLOZ TANISINDA KULLANILAN YENİ YÖNTEMLER

Prof. Dr. Mustafa BAKIR
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul

Toplumda tüberküloz hastalığının (TB) konrol altına alınmasında en etkili yöntem, basil saçan hastaların bulunarak etkin biçimde tedavi edilmesi ile birlikte bu kişilerin enfekte ettiği sağlıklı bireylerin belirlenerek hastalıktan koruyucu ilaç verilmesi şeklinde özetlenebilir. Tüberküloz basili ile enfekte olan bireylerde tüberküloz hastalığı gelişme olasılığı kişinin yaşına ve bağışıklık sisteminin durumuna bağlı olarak değişir. Sağlıklı erişkinlerde bu olasılık tüm yaşam boyunca %10 iken 2 yaşın altında %20-40 oranına kadar yükselebilmekte, immündüşkün veya bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda da yüksek bulunmaktadır. Toplumda tüberküloz enfeksiyonu (TBE) havuzunun büyüklüğü reaktivasyon TB sıklığını da artırmaktadır. Bu nedenle özellikle enfekte olduktan sonra hastalık geliştirme riskinin yüksek olduğu kişilerde TBE doğru biçimde teşhis edilmeli, böylelikle erken koruyucu tedavi hastalık riski azaltılırken diğer yandan gereksiz ilaç tedavisinin yan etki olasılığı da azaltılmalıdır.

TBE tanısında yaklaşık bir asırdır kullanılan tüberkülin cilt testi (TCT), 200 den fazla proteinin karışımı olan *M. tuberculosis* pürifiye protein derivesi (PPD) kullanılarak cilt içine uygulanmaktadır. Bu karışımın içinde *M. tuberculosis*'e özgü antijenler olduğu gibi, *M. bovis* BCG ve non-tüberküloz mikobakterilere (NTM) ait antijenler de bulunmaktadır. PPD intradermal yolla uygulandıktan 48-72 saat sonra TBE, BCG aşısı veya NTM ile önceden karşılaşmış kişilerin cildinde, PPD antijenlerini tanıyan mononükleer hücrelerin neden olduğu inflamasyon sonucunda farklı büyüklüklerde endurasyon ve eritem yanıtı oluşmaktadır. Bu yanıtın büyüklüğü, PPD antijenlerine verilen hücresel bağışıklık yanıtının derecesine, kişinin yaşına, enjeksiyon tekniğine, endurasyon çapınınölçen kişiye göre değişkenlik gösterebilmekte, test sonucunun okunması için ikinci bir vizit gerektirmekte, elde edilen ölçüm değerinin pozitif veya negatif olarak değerlendirilmesinde kullanılan eşik değerler TB prevalansına göre ülkeden ülkeye farklı düzeylerde seçilmekte, kullanılan eşik değeri küçüldüğü oranda TBE için duyarlılık yükseldikçe özgüllük azalmaktadır. TCT duyarlılığı genel olarak

yaklışık %65, BCG aşısının rutin olarak uygulandığı ülkelerde özgüllüğü yaklaşık %35 olarak bildirilmektedir. Özellikle anti-TNF-alfa ve uzun süre kemoterapi veya kortikosteroid gibi immünosupressif tedavi uygulanacak kişilerde ve küçük bebeklerde TBE sonrası gelişebilecek yaygın TB riski karşısında bu oranlar oldukça düşük kalmaktadır.

Son yıllarda *M. tuberculosis* genomu ve kodladığı proteinlerle ilgili arsaştırmalar sonucu RD1 (region of difference-1) geninin kodladığı ESAT-6 (early secreted antigen target 6 kDa), CFP-10 (Culture filtrate protein 10 kDa) ve TB7.7 antijenlerin patojenite ile ilişikisi yanında *M. tuberculosis*'e özgül proteinler olduğu, BCG kökeni aşı yapımı amacıyla pasajlanırken RD1 genini kaybettiği için hiç bir BCG kökeninde bu genin bulunmadığı, nadiren hastalık etkeni olan *M. kansasii, M. marinum, M. szulgai, M. flavescens ve olasıkıkla M. lepra* haricinde NTM'lerin RD1 genine sahip olmadığı saptanmıştır. Bu antijenlerin *M. tuberculosis*'e özgüllüğünün yükek olması, TBE tanısında immünolojik testlerde kullanılması sonucunu doğurmuştur. Özgün antijenlerle in vitro inkübe edilen monükleer hücreler daha önce bu antijenlerle karşılaşmışsa interferon gamma (IFN-g) salgılamakta, uyarılmış kanın serumunda IFN-g düzeyi veya bunu salgılyan özgün lenfositlerin sayısı duyarlı testlerle belirlenebilmektedir.
Ticari olarak dünya piyasasında bulunan IFN-g testleri QuantiFERON-TB Gold® In-Tube ile T SPOTTM.TB dir.
Cellestis (Carnegie Victoria, Australya;cellestis.com) tarafından üretilen QuantiFERON-TB Gold® In-Tube testinde ESAT-6, CFP-10 ve Tb7.7 antijenleri kullanılır. Biri antijenle kaplı diğer negatif kontrol olan 2 tüpe 1'er ml tam kan örneği alındıktan sonra 37oC sıcaklıkta 16-24 saat inkübe edilir. Eğer mononükleer hücreler daha önce bu antijenlerle karşılaşmışsa inkübasyon sırasına süpernatan içine IFN-g salgılar, karşılaşmamışsa salgılamaz. IFN-g'nın ELISA ile belirlenebilmes için 200 mikrolitre plazma gerekir. Antijenle uyarıldıktan sonra bu plazma 2-8oC'de 4 hafta, -20oC'de 3 aya kadar saklanıp sonra çalışılabilir. ELISA sonucu elde edilen değer 0.35 IU/ml üzerinde ise pozitif kabul edilir. Kit içinde pozitif kontrol (Fitohemaglutinin) yoktur.
Oxford Immunotec (Oxford, İngiltere; www.oxfordimmunotec.com) tarafından üretilen T SPOTTM.TB testi IFN-g üreten hücrelerin sayılması esasına dayanır. ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerinin uyarıcı olarak kullanıldığı bu test için erişkinden 4 çocuktan 2 ml kan alınması ve fikol içeren özel tüp içinde isantrifüje edildikten

sonra mononükleer hücrelerin ayırılması gerekir. 250.000 hücre anti-interferon monoklonal antikoru ile kaplanmış ELISPOT plaklarının kuyucuklarındaki sıvı hücre kültürü vasatına konulup 3 kuyucuktan her birine ESAT-6, CFP-10, fitohemaglutinin antijenleri eklenerek, son kuyucuğu birşey eklenmeden 37oC sıcaklıkta %5 karbondioksit içeren ortamda 16-20 saat inkübe edilir. Sonra IFN-g'ya karşı ikinci antikor ile kromojenik substrat ortama eklenir. Plağın tabanındaki monoklonal antikora bağlanmış IFN-g varsa enzimle konjuge ikinci antikor buna bağlanır, enzim ortama eklenen kromojenik substratı parçaladığında plağın tabanında koyu renkli noktacıklar oluşur (spot). Her spot bir özgün T hücresini gösterir. Spotlar gözle veya optik okuyucu aracılığı ile sayılabilir. Üretici eşik spot sayısını >5 olarak belirlemiştir. Eğer negatif kontrol kuyucuğunda da spotlar varsa o zaman pozitif test kriteri, antijen kuyucuğundaki spot sayısının negatif kontrol kuyucuğundakinin en az iki katı olmasıdır. Pozitif kontrol kuyucuğu da en az 20 spot içermelidir. Örnek alındıktan sonra en geç 8 saat içinde testin çalışılması önerilmektedir.

IFN-g testlerinin duyarlılığı aktif bakteriyolojik olarak kanıtlanmış tüberkülozda %82 ile %100 arasında değişmektedir. Tüm çalışmalarda bu testlerin duyarlılığı gerek normal gerekse bağışıklığı baskılanmış olan kişilerde TCT'den daha yüksek bulunmuştur. IFN-g testlerinin özgüllüğü de %98 civarındadır ve TCT'den çok daha yüksektir.

Latent TB enfeksiyonunun (LTBE) tanısında altın standart olmadığı için IFN-g testlerinin bu durum için duyarlılık ve özgüllüğünü tam olarak belirlemek mümkün değildir. ELISPOT yöntemi ile TB insidensinin yüksek olduğu Hindistan'da LTBE prevalansı %80, İngiterede TB temas öyküsü olmayan BCG aşılı düşük risk grubunda %0 bulunmuştur. ELISPOT yöntemi ile yapılan temaslı tarama çalışmalarında da temas derecesi ile ELISPOT sonuçları arasındaki korelasyonun TCT ile temas yoğunluğu arasındaki korelasyondan daha yüksek olduğu saptanmıştır. LTBE tedavisi sonrasında tedavinin etkinliğini gösteren bir test mevcut değildir. TCT tedavi sonrası negatifleşmemektedir. IFN-g testinin tedavi sonrası nasıl değiştiği ile ilgili çalışmalar yeterli değildir. ELISPOT testi, HIV enfeksiyonu olan, malnütrisyonu olan ve çocuk hastalarda da TCT testinden önemli ölçüde yüksek duyarlılıkta bulunmuştur.

Sonuç olarak, TB enfeksiyonu şüphesi olduğunda özellikle TCT sonucunun klinisyeni ikna etmediği durumlarda, çocuklarda, malnütrisyonu olanlarda, bağışıklığı baskılanmış veya yetersiz olan hastalarda, TB ayırıcı tanısı problemi olan olgularda,

TB menenjitte, organ nakli ve anti-TNF tedavisi öncesinde IFN-g'ya dayalı testler özgüllükleri ve duyarlılıkları yüksek olduğu için klinisyene önemli ölçüde yardımcıdır.

KAYNAKLAR

1. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, et al. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:65-9.
2. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak. Lancet 2003;361:1168-73.
3. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen specific T cells. Lancet 2001;357:2017-21.
4. Soysal A, Millington KA, Bakir M, Dosanjh D, Aslan Y, Deeks JJ, Efe S, Staveley I, Ewer K, Lalvani A. Effect of BCG vaccination on risk of Mycobacterium tuberculosis infection in children with household tuberculosis contact: a prospective community-based study. Lancet. 2005;366:1443-51.
5. Tsiouris SJ, Coetzee D, Toro PL, Austin J, Stein Z, El-Sadr W. Sensitivity analysis and potential uses of a novel gamma interferon release assay for diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol. 2006;44:2844-50.
6. Davies PD, Drobniewski F.The use of interferon-gamma-based blood tests for the detection of latent tuberculosis infection. Eur Respir J. 2006;28:1-3.
7. Codecasa L, Mantegani P, Galli L, Lazzarin A, Scarpellini P, Fortis C. An in-house RD1-based enzyme-linked immunospot-gamma interferon assay instead of the tuberculin skin test for diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. J Clin Microbiol. 2006;44:1944-50.
8. Harada N, Nakajima Y, Higuchi K, Sekiya Y, Rothel J, Mori T.Screening for tuberculosis infection using whole-blood interferon-gamma and Mantoux testing among Japanese healthcare workers.Infect Control Hosp Epidemiol. 2006;27:442-8.
9. Connell TG, Curtis N, Ranganathan SC, Buttery JP. Performance of a wholeblood interferon gamma assay for detecting latent infection with Mycobacterium tuberculosis in children. Thorax. 2006;61:616-20.

10. Brock I, Ruhwald M, Lundgren B, Westh H, Mathiesen LR, Ravn P. Latenttuberculosis in HIV positive, diagnosed by the M. tuberculosis specificinterferon-gamma test. Respir Res 2006;7:56.
11. Dewan PK, Grinsdale J, Liska S, Wong E, Fallstad R, Kawamura LM.Feasibility, acceptability, and cost of tuberculosis testing by whole-bloodinterferon-gamma assay. BMC Infect Dis. 2006;6:47.
12. Piana F, Codecasa LR, Besozzi G, Migliori GB, Cirillo DM. Use of commercialinterferon-gamma assays in immunocompromised patients for tuberculosisdiagnosis. Am J Respir Crit Care Med. 2005;172:631-5.

LATENT TÜBERKÜLOZ ENFEKSİYONU TEDAVİSİ

Doç. Dr. Haluk C. ÇALIŞIR
İstanbul Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul

Tüberküloz hastalığı, bulaşma ve patogenezi açısından diğer enfeksiyon hastalıklarından ayrılmaktadır. Hastalık etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* insanlara bulaştığında, önce enfeksiyon oluşmaktadır. Enfekte olan hastaların tümünde hastalık gelişmemekte ilk iki yıl içinde enfekte olan bireylerin yaklaşık %10'unda hastalık ortaya çıkmaktadır. Bu süre içinde hastalık gelişmeyen bireylerde ömür boyu hastalık gelişme olasılığı %10'dur. Buraya kadar verilenlerden aşağıdaki saptamalar yapılabilir.

1. Hastalığın ortaya çıkması için, mutlaka önce enfeksiyonunun oluşması gerekir.
2. Basille karşılaşan her bireyde hastalık oluşmamaktadır.
3. Zaman ile, enfeksiyon halinin hastalığa dönüşme olasılığı azalmaktadır.
4. Enfeksiyon oluşumu ile hastalığın ortaya çıkışı arasında bir süre geçmektedir.

HIV ile enfekte olma, diyabet hastalığı, silikozis v.b bazı durumlarda ise enfeksiyonun hastalığa dönüşme olasılığı, ek hastalığı olmayanlara göre artmaktadır.

Tüberküloz hastalığının bu özelliği, toplum düzeyinde hastalıkla mücadele değişik stratejiler oluşturulmasına yol açmıştır. Bulaş zincirinde 3 nokta bulunmaktadır (1).

1) Hasta birey- Sağlam birey: Özellikle akciğer tüberkülozlu hastalardan, daha önce *Mycobacterium tuberculosis* ile hiç karşılaşmamış sağlam bireylere basilin solunum yolu ile bulaşması olarak tanımlayabiliriz. Hastalık zincirini oluşturan en önemli noktadır. Bu süreç için yapılacak en önemli müdahale bulaştırıcı hastaların erken tespiti ve doğru tedavisine dayanmaktadır. Böylece sağlam bireylere hastalığın bulaşması önlenecektir.

2) Sağlam birey- Enfekte birey: Sağlam bireylerin hastalar ile karşılaşmasının kaçınılmaz olduğu durumlardır ve genellikle bütün içinde çok nadir görülen kısmını oluşturmaktadır. Durumu tanımlayacak en tipik örnek aktif hasta bir anneden doğacak bebeğin durumudur. Bebek basil ile hiç karşılaşmamıştır, ancak anne ile çok yakın ilişki içinde olacağı için hastalığın bulaşması kaçınılmaz olarak görülmektedir. Bulaşmayı bu arada engellemek için bebeğe yapılacak tedavi

koruyucu özelliktedir. Bu tedavi şekline profilaktik tedavi, koruyucu tedavi adı verilmektedir. Hastalığın toplum içinde enfeksiyon zincirinin devamı açısından bakıldığında bu anlamda çok küçük bir katkı sağlamaktadır.

3) Enfekte birey- Hasta Birey: Daha önce de belirtildiği gibi, enfekte olan her bireyde hastalık gelişmemektedir. Hastalık gelişme riski olan bireylerde yapılan tedavi Latent Tüberküloz Tedavisi olarak adlandırılmaktadır. Toplumda tüberküloz hastalığı sıklığı belirli bir seviyenin altına düştüğü zaman, tedavi edici etkinliklere ek olarak önem kazanmaktadır. Bu duruma en iyi örnek Amerika Birleşik Devletleri'dir (2).

Tüberküloz ile mücadele ya da kontrol için yapılan aktiviteler arasında, tüberkülin testi ile enfekte olmuş bireyleri saptama ve onları tedavi etme uygulaması yıllardır yapılan bir uygulamadır. Toplumda tüberkülin testi pozitif bireylerin saptanması ve bunların tedavisi şeklinde yapılacak bir uygulama, milyonlarca kişinin tedavisi gibi bir sonucu olasılık haline getirmektedir. Tüberkülin testi pozitif olan tüm bir toplumun büyük bir kesiminin tedavisinden çok, enfeksiyondan hastalığa dönüşüm riski yüksek riskli bireyleri saptayıp tedavi etme yaklaşımı benimsenmektedir. Bu yaklaşım "Hedefli Tüberkülin Testi Taraması" (Targeted Tuberculin Testing) olarak adlandırılmaktadır. Riskli gruplar dışında çeşitli nedenlerle tüberkülin testi taraması yapılması önerilmemektedir (3). Riskli gruplarda yer alan bireylerin tedavisi daha önce "kemoprofilaksi" "proflaksi" olarak adlandırılırken, 1999 yılında Amerikan Toraks Derneği, bu adlandırmanın "Latent Tüberküloz Enfeksiyonu Tedavisi" olarak değiştirilmesini önermiştir3.

Tüberküloz Kontrolü ve Latent Tüberküloz Enfeksiyonu Tedavisi: Bir hastalığın insidansında, prevalansında, morbititesinde ve mortalitesinde azalmanın sağlanması ve bu azalma eğiliminin sürekli kılınması HASTALIĞIN KONTROLÜ; kontrol için yapılan bütün uygulamalar sonucunda bir coğrafi bölgede hastalık sıklığının sıfıra indirilmesi ise HASTALIĞIN ELİMİNASYONU olarak adlandırılmaktadır (4). Tüberküloz konrolü ve eliminasyonu için değişik stratejik yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunun en temeli ve en etkini saptanan hastaların tedavisine yönelik stratejik uygulamalardır ki, günümüzde bu yaklaşım Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi olarak bilinmektedir. Bu nedenle de, çeşitli metinlerde verilen tüberküloz kontrolü hedefleri vaka bulma ve tedavi etmeye yöneliktir. Etkin tüberküloz kontrolü için toplumdaki hastaların %70'ini saptayacak uygulamaları rutin hale getirmek, saptanan bu hastaların da %85'ini kür etmeye

yönelik yaklaşımları tüberküloz kontrolünün temeli olarak ortaya koymak gerekmektedir (5). Tüberküloz hastalığı sıklığı bakımından beş değişiklik düzeyde incelenmektedir. 1000/100 000 üstü SALGIN; 100 ile 1000/100 000 arası YÜKSEK DÜZEYDE; 10 ile 100/100 000 arası ORTA DÜZEYDE; 1 ile 10/100 000 arası DÜŞÜK DÜZEYDE sıklığı ifade ederken, insidansın 1/100 000 altına düşmesi ise ELİMİNASYON FAZI olarak tanımlanmaktadır (6).

Dünya Sağlık Örgütü ve tüberküloz kontrolü konusunda en önemli iki kuruluş olan "International Union Against Tuberculosis and Lung Disease" (IUATLD) rehberlerinde, sistematik latent tüberküloz enfeksiyonu tedavisi yapılması konusunda bir öneri bulunmamaktadır. Bu rehberlerde kontrol fazındaki ülkelerde vaka bulma ve tedavi etkinlikleri ile ilgili öneriler yer almaktadır. Latent tüberküloz enfeksiyonu tedavisinin kontrol programının bir parçası olarak sistematik olarak uygulanması eliminasyon fazına girmiş ülkelerde uygulanabileceği belirtilmektedir (7, 8). Bu durumua gelmiş ülke sayısı oldukça azdır. Tüberküloz kontrolünde latent enfeksiyonun sistematik olarak önerildiği en önemli kaynak Amerikan Toraks Derneği, Center for Disease Control (CDC), American Academy of Pediatrics(AAP), ve Infectious Diseases Society of America (IDSA) adlı kuruluşlar tarafından hazırlanan rehberlerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde tüberküloz hasta insidansı 1980 yılında yüz binde 12 iken, 2005 yılında yüz binde 5 düzeyindedir (9). Uzun yıllardır eliminasyon fazına oldukça yaklaşmış bir hastalık sıklığında bulunmaktadır. Bu nedenle bu ülkedeki bilimsel kuruluşların latent tüberküloz enfeksiyonu tedavisini, tüberküloz kontrolünün bir elementi olarak önermesi anlaşılır bir durumdur.

Tüberkülozun daha sık olduğu ülkelerde, tüberküloz kontrolünün bir parçası olarak latent tüberküloz enfeksiyon tedavisinin yer almamasının nedenlerinin temelinde, bu uygulamanın operasyonel olarak başarılmasının zor ve maliyet etkin olmamasından kaynaklanmaktadır. Bulaştırıcı olan hastalara ve bulaşın kırılmasına yönelik tanı ve tedavi girişimleri hastalığın sıklığının azalmasında, önemli epidemiyolojik katkı sağlamaktadır. Latent tüberküloz enfeksiyonu tedavisinin (burada ülke stratejisi olarak kullanılması kast edilmemektedir.) etkinliği bilinmektedir ve bu konuda yeterli bilimsel kanıtlar bulunmaktadır. Ancak bu konuda yapılacak toplum düzeyinde yapılacak operasyonel işlemler, daha etkin olan tanı ve tedavi etkinliklerinin önüne geçebilecek kadar yoğun

olabilmektedir. Tanı ve tedavi uygulamaları ile kabaca bir kişinin hasta olmasını önlemek için bir hastanın tedavi edilmesi gerekmekteyken, latent tüberküloz enfeksiyonu tedavisinin stratejik kullanımında, yukarıda bahsedilen koşullarda 1 kişinin hasta olmasını önlemek için 111 kişiye bu tedaviyi vermek gerekebilmektedir (10). 111 kişiye yapılan tanısal ve operasyonel işlemler, bu tedavinin 9 ay süreyle verilmesi ve bu sürecin operasyonel olarak yönetilmesi düşünüldüğünde ulusal kontrol programlarını hantallaştırabilme riski, hedeflerinden uzak kalabilmesi söz konusudur.

Latent tüberküloz enfeksiyonu tedavisi ile bu arka plan tartışmaları verdikten sonra, tüm epidemiyolojik koşullarda latent enfeksiyon tedavisinin tartışmasız önerildiği durumlar (11, 12) aşağıda verilmiştir.

1. Mycobacterium tuberculosis enfeksiyonu ile birlikte HIV infeksiyonunun bir arada olduğu hastalar.
2. Tüberkülozlu bir hasta ile aynı evde yaşayan 5 yaş ve altı çocuklar,
3. Yakın zamanda (bir yıl içinde) tüberkülin testinde konversiyon saptanan hastalar.

Amerikan Toraks Derneği önerileri ise, tüberkülin testinin yapıldığı risk gruplarında yapılan tüberkülin testi çapına göre belirlenmiştir (3).

Tüberkülin testi çapı:
5 mm ve üzerinde bulunan hastalar.

- HIV (+) kişiler
- TB hastası ile yeni temas
- Göğüs radyografisinde tedavi edilmemiş fibrotik değişiklikler
- Organ transplantlı veya diğer immunsuprese hastalar (1 ay veya daha fazla süreli 15mg/gün prednisone kullanımı)

10 mm ve üstü hastalar.

- Yüksek prevalanslı ülkelerden yeni göç
- IV ilaç kullananlar
- Hapishane, bakım evleri, huzur evleri, evsizler
- Mikobakterioloji laboratuar çalışanları
- Silikozis, DM, KBY, bazı hematolojik hastalıklar,baş-boyun akciğer gibi bazı maligniteler,

- >%10 kilo kaybı, gastrektomi, jejunoileal bypass
- < 4 yaş

15 mm ve üstü saptanan hastalar.

- Tüberküloz için herhangi bir riski bulunmayan hastalar.

Tedavi için isoniazid ile önerilen süre 9 aydır. Isoniazid kullanılamayan durumlarda 4 ay süre ile rifampisin ya da 2 ay süreyle rifampisin ve pyrazinamid kullanılabilir. Bu sürelerde ilaçlar her gün alınmalıdır.

Ülkemizde tüberküloz insidansı 2005 yılında yüz binde 27 olarak bildirilmiştir (9). Orta sıklıkta bir ülke ve henüz eliminasyon fazına girmemiş olmamıza karşın, latent tüberküloz enfeksiyonu tedavisi sistematik olarak önerildiği görülmektedir. Bu durum tartışmalı bir konudur.

KAYNAKLAR:

1. Rieder H. Epidemiologic Basis of Tuberculosis Control.First Ed.1999. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Paris, 9

2. Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Essential components of a tuberculosis prevention and control program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. M.M.W.R. 44(No. RR-1):1–16.

3. American Thoracic Society. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161 (4 Pt 2): S221–S247.

4. Dowdle WR.The principles of disease elimination and eradicationBull.WHO.1998;76:(suppl):22-5

5. Pio A, Chaulet P.: Tuberculosis Handbook..p70.World Health Organization.1998.WHO/TB/98.253

6. Clancy L,Rieder HL,Enarson DA, Spinachi S.:Tuberculosis elimination in the countries of Europe and other industrialized countries. Eur Respir J 1991;4:1288-12

7. Rieder HL.:Interventions for Tuberculosis Control and Elimination.. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.(2002) ,8
8. Dye C, Garnett GP, Sleeman K, Williams BG. Prospects for worldwide tuberculosis control under the WHO DOTS strategy. Lancet 1998; 352: 1886–91
9. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization WHO/HTM/TB/2007.376)
10. Rieder HL.:Interventions for Tuberculosis Control and Elimination.. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.(2002), 144
11. Luna JAC. A Tuberculosis Guide for Specialist Physicians.International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.2003,245
12. Enarson DA,Rieder HL, Arnadottir T, Trébucq A. Management of Tuberculosis. A Guide for Low Income Countries. Fifth Ed. 2000.International Union Against Tuberculosis and Disease.Paris. 2000,

TÜRKİYE VE DÜNYADA TÜBERKÜLOZUN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Prof. Dr. Rıza DURMAZ
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Tüberküloz yılda yaklaşık iki milyon kişinin ölümüne yol açan önemli infeksiyon hastalıklarından biridir. Dünya nüfusunun üçtebiri *Mycobacterium tuberculosis* ile infekte durumdadır. Bu hastalık bütün toplumlarda görülmekle birlikte olguların çoğu az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gözlenmektedir (1). Gelişmekte olan ülkeler arasında yer alan Türkiye, Dünya Sağlık Örgütü kayıtlarına göre 2004 yılı için yıllık 28/100.000'lik tüberküloz insidansı ile halen orta insidansa sahip ülkeler arasında yer almaktadır. Yılda 18.000-20.000 tüberküloz hastası rapor edilmekte, olguların yaklaşık 69%'u akciğer tüberkülozlu (2-3), %60'ı erkek (4-6) ve her iki cinsiyette en yüksek prevelans 15-24 yaş grubunda gözlenmektedir (5).

Tüberküloz insidansını gelişmiş ülkelerdeki seviyeye düşürmede erken tanı, doğru tedavi ve etkin korunma-kontrol önlemlerinin önemi açıktır. Etkin kontrol önlemlerinin alınmasında infeksiyonun kaynağı ve bulaş yollarının bilinmesinin büyük önemi vardır. Moleküler tiplendirme yöntemleriyle *M. tuberculosis*'in kaynak ve bulaş yolları belirlenmekte, hastalığın yayılma dinamikleri hakkında yeni bilgiler edinilmekte, böylece tüberkülozun epidemiyolojisi hakkındaki bilgimiz artmaktadır (7,8). Genellikle, moleküler tiplendirmede aynı grup içinde yer alan (küme oluşturan) *M. tuberculosis* suşlarının izole edildiği hastaların, tüberkülozu yeni bulaş sonucunda aldıkları kabul edilmektedir (9, 10). Yeni bulaş oranı hakkındaki bilgiler, tüberkülozun önlenmesi için daha etkili olabilecek programların geliştirilmesine büyük katkı sağlamaktadır (11). Moleküler tiplendirme yöntemleriyle aynı etkene bağlı olarak sürekli tekrarlanan dış kaynaklı bulaş, endojen kaynaklı yeniden aktive olan bir latent enfeksiyondan ayırt edilebilmektedir. Böylece herhangi bir toplumda tüberküloz için uygulanmakta olan tedavi ve kontrol önlemlerinin etkinlikleri hakkında bilgi edinilebilmektedir (12). Ayrıca moleküler tiplendirme yöntemleriyle spesifik *M. tuberculosis* klonları (Beijing/W, LAM7-TUR, gibi) veya çoğul ilaca dirençli *M. tuberculosis* (ÇID-*M.*

tuberculosis) suşlarının herhangi bir bölge, ülke veya dünya genelindeki filogenetik seviyede yaygınlığı hakkında bilgi sağlanabilmektedir (8,13-15). Tüberkülozun moleküler epidemiyolojisine yönelik olarak *IS6110-restriction fragment length polymorphism* (IS*6110*-RFLP), spoligotipleme, *mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRUs)-*variable number tandem repeats* (VNTR), *pTBN12 fingerprinting*, *arbitrarily primed*-polimeraz zincir reaksiyonu gibi çeşitli yöntemler denenmektedir (8, 16, 17). Bunlardan IS*6110*-RFLP, van Embden ve arkadaşları tarafından ilk olarak geliştirildiği 1993 yılından beri *M. tuberculosis* suşlarının moleküler epidemiyolojisinde "altın standart" olarak durmaktadır. Yüksek seviyede ayırım gücünden dolayı, yeni geliştirilen polimeraz zincir reaksiyon (PZR) esaslı metotların doğrulanmasında kullanılmaktadır (7, 18). Yöntemin majör dezavantajları; uzun zaman alması, düşük sayıda (5) IS*6110* kopyası bulunduran suşların ayrımında yetersiz olması ve sonuçlarının bilgisayar ortamına aktarılamamasıdır (4, 6). IS*6110*-RFLP yöntemindeki problemlerin üstesinden gelmek için 1997 yılında Goguet de la Salmoniere ve arkadaşlarınca PZR esaslı bir tiplendirme yöntemi olan spoligotipleme (spoligotyping) uygulamaya konuldu. Bu yöntem; IS*6110*-RFLP ile tiplendirilecek suşların sayısını azaltmak için bir ön tarama metodu olarak ve *M. tuberculosis* izolatlarının filogenetik analizi için oldukça faydalıdır (13, 14, 19, 20). Fakat yalnız başına kullanıldığında genetik heterojeniteyi saptamada yetersizdir (17, 21). Çok yeni olarak, 2001 yılında Supply ve arkadaşları MIRU-VNTR *(Mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeat)* tiplendirme yöntemini tanımladılar. Bu yöntem, *M. tuberculosis* izolatlarının (özellikle düşük kopyalı olanların) moleküler epidemiyolojisi ve popülasyon yapısının analizinde IS*6110*-RFLP'nin alternatifi olarak önerilmektedir (7, 22-26). Yüksek ayırım gücü, yöntemin kısa sürede sonuç verebilmesi, laboratuarlar arasında karşılaştırılabilir dijital sonuçlar alınması, MIRU-VNTR yöntemini fazla sayıdaki *M. tuberculosis* izolatlarının tiplendirilmesinde cazip bir teknik haline getirmektedir.

Birçok ülkenin farklı topluluklarındaki tüberküloz hastalarından üretilmiş *M. tuberculosis* izolatları arasında klonal ilişkiyi araştırmak amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ülkemizde de *M. tuberculosis* kökenlerinin moleküler epidemiyolojisi üzerindeki çalışmalar hızla artmaktadır (4, 6, 15, 27-34). Bu konuda yapılmış olan çalışmaları, moleküler tiplendirme yöntemlerinin kronolojik gelişimi açısından üç başlık altında sunmak yararlı olacaktır.

I-IS*6110*-RFLP ve pTBN12-RFLP yöntemleriyle ilgili çalışmalar

II-IS*6110*-RFLP ve Spoligotipleme ile ilgili çalışmalar
III- IS6110-RFLP, Spoligotipleme ve MIRU-VNTR ile ilgili çalışmalar

I-IS6110-RFLP ve pTBN12-RFLP yöntemleriyle ilgili çalışmalar: Bu yöntemlerle ülkemizin farklı illerinden toplanan 434 *M. tuberculosis* izolatlarının genotipik profil farklılıkları çalışılmıştır (4, 6, 27). İncelenen suşların %90'dan fazlası akciğer tüberkülozu olan olgulara ait ve hastaların %60'dan fazlası erkek. Bu çalışmaların ortak bir değerlendirmesi yapıldığında şu sonuçlar ortaya çıkmaktadır:
1) İncelenen izolatlardaki IS*6110* kopya sayıları 1-18 arasında değişmektedir. IS*6110* koysa sayısı düşük (5 kopya) olan suşların oranı %25-40.5 arasında değişmektedir. Düşük kopya sayılı suşların oranı Asya ülkelerinde 26-49 (35-37), Avrupa ülkelerinde 6-16'dır (9,35,38). Ülkemizde bulunan değerler ülkenin coğrafik konumuyla uygunluk içindedir.
2) İki tiplendirme yönteminin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; ülkemizdeki suşlar arasında saptanan kümeleşme oranı %34-50.5, yeni bulaş oranı %21.6-31.5 arasındadır.
3) Farklı coğrafik bölgelerden izole edilen tüberküloz basillerinin ortak RFLP profili oluşturdukları gözlenmiştir. Bu durum bir bölgede basili alan kişilerin nüfus hareketliliğine bağlı olarak tüberkülozu ülke geneline yayabileceği riskini doğrulamaktadır.
5) Yaş, cinsiyet, alkol tüketimi, Diabetes mellitus, önceden tüberküloz geçirmiş olmak ve anti-tüberküloz ilaçlarına dirençli olmanın suşların grup oluşturması üzerine anlamlı derecede etkili olmadığı gösterilmiştir.
6) Bulgular, tüberküloz olgularının önemli bir kısmının aile içi bulaş sonucu geliştiğini desteklemektedir.
7) Klasik epidemiyolojik veri toplamada yetersiz kalınmaktadır. Özellikle küme içinde yer alan hastalar arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi saptamaya yönelik çalışmalardan edinilen sonuçlara göre, küme oluşturan hastalar arasında doğrudan bir ailesel ya da sosyal ilişki bulunamıyor veya çok düşük oranlarda kaydedilebiliyor (4, 6, 27).

***II-* IS*6110*-RFLP ve *Spoligotipleme ile ilgili çalışmalar*:** Spoligotipleme yöntemi tek başına veya IS*6110*-RFLP ile birlikte kullanılarak ülkemizde yaklaşık 5000 kadar *M. tuberculosis* suşu çalışılmıştır (28-33). Bu araştırmaların bulguları Tablo'da özetlenmiştir. Buradan şu sonuçlar çıkarılabilmektedir:

Tablo. Spoligotipleme ile ülkemizde yapılmış araştırmaların sonuçları

Suşların coğrafik orijini	Suş sayısı	Spoligotipleme sonuçları					Kaynak
		Kümeleşme oranı (%)	Dünya veri bankasında olmayan özgü suşların sayısı (%)	Major ST(%)	Major familyalar	Dünya veri bankasında olmayan yeni ST'ler	
Ankara	114	85	8(7)	ST53 (27) ST41 (7.9) ST118 (7) ST50 (5.3)	Geçici tanımlanmış T (27) LAM7-Tur (7.9) Haarlem (5.3) Beijing (1.8)	ST2136 ST2139 ST2135 ST2140	28
Malatya	145	80.2	6(4.1)	ST41 (23.9) ST53 (22.5) ST50 (5.8) ST204 (5.8 ST62 (4.3)	Geçici tanımlanmış T(46) LAM (29, LAM7-Tur;23.9) Haarlem (15.9) S (3.6) X (0.7)	ST759 ST1936 ST1937 ST1938 ST2285	30
Malatya-İstanbul-Adana	200	76	9 (4.5)	ST41 (22.5) ST53 (19.5) ST50 (6.5) ST1261 (4.5) ST47 (3.5)	T süper familyası (29) LAM (33.5, LAM7-Tur; 22.5) Haarlem (14) S (3)	ST1973 ST2160 ST2161 ST2163 ST2595	31
İç Anadolu, Karadeniz, Doğu Anadolu, Akdeniz	381	77	-	-	T familyası (37) LAM (20) Haarlem (8) Beijing (2)	-	32
Malatya	220	82.7	24 (10.9)	ST53 (25) ST41 (8.6) ST 284 (6.8).	Geçici tanımlanmış T (50.9) LAM (15) Haarlem (10.9) S familyası (4.1) X (2.3) Beijing/W (1.4) CAS1- Delhi (0.5)	-	33
İstanbul	4069				Beijing (1.13)		29*
Zonguldak	128	73	6 (4.7)	ST53 (21.9) ST41 (14.0) ST50 (7.8) ST42 (4.7) ST 47 (4.7)	T1 familyası (21.9) LAM7-Tur (14.0) Haarlem (7.8)	ST2120 ST2125 ST2127 ST2128	34

ST:*Shared type*, LAM; *Latino-American-Mediterranean*, CAS1-Delhi: *Central Asian-Delhi*, *: Bu çalışmada yalnızca Beijing familyasına ait sonuçlar bulunmaktadır.

1) Spoligotiplendirme sonuçlarına göre incelenen izolatların kümeleşme oranı %67-85 arasında değişmektedir. Bu oran kabul edilemeyecek kadar yüksektir. Nitekim spoligotiplendirme sonuçları IS*6110*-RFLP ve/veya MIRU-VNTR yöntemleriyle tekrarlandığında kümeleşme oranlarında oldukça yüksek değerlere (%30-40) varan azalmalar olmaktadır. Bu durum spoligotiplendirme yönteminin kökenler arasındaki klonal ilişkiyi değerlendirmede uygun olamayacağını bir kez daha kanıtlamaktadır.

2) Sıklıkla saptanan "shared type" (ST) şöyledir: ST41 (Latino-American-Mediterranean: LAM7-TUR, %8.6-22.5), ST53 (geçici olarak tanımlanmış T1 süperfamilya, %16.3-27), ST118 (geçici tanımlanmış T familya, %7), ST50 (Haarlem 3 familyası, %5.3-6.5) ve ST284 (isimlendirilememiş familya, %3-5.7). Bu tiplerin Türkiye ve dünyadaki dağılımlarına bakıldığında; ST41'in Türkiye için en yaygın tip olduğu, ST53 ve ST50'nin Türkiye ve dünyanın diğer kısımlarında eşit dağılım gösterdiği (30, 39), ST284 (oktal kod: 037637777760771)'ün ise dünya veri bankasında çok nadir olduğu (Bulgaristan'da %5.4, Avusturya'da %1.9, Suudi Arabistan'da %1.4) (30, 31) ve bu tipin de lokal filocoğrafik özellik gösterdiği belirtilmiştir (15). Komşu ülke Iran'da yapılan çalışmada bizden farklı olarak yaygın görülen ST'ler sırasıyla ST47, ST11, ST26 ve ST1' dir (40).

3) Ülkemizde saptanan major *M. tuberculosis* familyaları: T süper familyası (%29-

45.7), LAM (29-37%), Haarlem (%10.9-15.9), S (%3-4.1) ve X (%0.7-2.3)'dir. İlginç olarak ülkemizin gerek Avrupa gerekse Asya kısmında yapılan çalışmalarda, esas olarak Asya ülkelerinde yaygınlık gösteren (41) "Central Asian" (CAS), "East-African Indian" (EAI) ve Beijing familyaları ya çok düşük (<%1.5) oranlarda saptanmakta ya da hiç bulunmamaktadır. Predominant *M. tuberculosis* familyalarının dağılımı topluluklara göre değişim göstermektedir. Örneğin Bejing ve Beijing benzeri suşların yaklaşık %50'si Uzak Doğuda, Haarlem familyasının %25'i Avrupa'da ve LAM suşlarının %50'ye yakını Güney Amerika'da bulunmaktadır (41). Çin'deki çoğul ilaca dirençli suşların %78'i, duyarlı olanların ise %60'dan fazlasını Bejing tipi oluşturmaktadır (42). T familyası dünya veri bankasındaki suşların yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Ülkemizde çok düşük oranlarda saptanan Beijing familyası komşumuz olan ülkelerden yapılan çalışmalarda; İran'da %9.4 (43), Rusya'da %44.5, Estonya'da %29.2 ve Azerbaycan'da %70.8 oranlarında bulunmaktadır (44, 45). Yine ülkemizde çok nadir görülen "Central Asian-Delhi" (CAS-Delhi) familyası Pakistan'daki izolatların %39'unu oluşturmaktadır (41). Güney Amerika ve İngiltere'de yaygın olan X familyası (41, 43)'da ülkemizde nadir olarak (%2.3) saptanan familyalardır.
4) Spoligotiplendirme sonuçlarına göre ülkemizden çalışılan izolatların %89.4-96'sına yakınında saptanan spoligotip profilleri dünya veri bankasında var olan genotip familyası veya alt familyalarının içerisinde yer almaktadır. Bunlar ülkemiz için özgü tiplerdir.
5) Ülkemizdeki *M. tuberculosis* suşları arasında dünya veri bankasında bulunmayan ve çalışma gruplarına göre sayıları 4-5 arasında değişen yeni ST'ler de bulunmaktadır.

IS6110-RFLP, Spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemlerinin kombinasyonu:
Yapılan çalışmalardan bu tiplendirme yöntemlerinin herhangi birisinin tek başına kullanılmasının *M. tuberculosis* suşları arasındaki genetik heterojeniteyi saptamada yetersiz kaldıkları anlaşılmıştır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada kümeleşme oranı IS*6110*-RFLP ile %35.9, spoligotipleme ile %83, 12 lokuslu MIRU-VNTR ile %69 olarak bulunmuştur. Düşük kopya sayılı suşlarda tek başına IS*6110*-RFLP'nin hatalı kümeleşmeye sebep olduğu; IS*6110*-RFLP ile aynı küme içinde yer alan iki kopya sayılı 13 suşun MIRU-VNTR ile 2 ve 7 suşlu iki küme ve 4 özgü tipe ayrıldığı kaydedilmiştir. Bu yöntemlerin kombine kullanılması halinde kümeleşme oranları: Spoligotyping/MIRUs, 48.9%; IS*6110*-RFLP/spoligotyping, 29.7% ; IS*6110*-

RFLP/MIRUs, 23.4% ve IS*6110*-RFLP/spoligotyping/MIRUs, 22% olarak bulunmuştur (30). IS*6110*-RFLP, yüksek IS*6110* kopya sayılı suşların ayrımında duyarlılığı oldukça yüksek bir metottur (16-18). Bu suşlardaki ayrım gücü 25 lokuslu MIRU-VNTRs veya MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemlerinin kombine kullanımından daha yüksektir (7). Ancak bu yöntem, özellikle düşük kopya sayılı suşlarda hatalı kümeleşmelere neden olmaktadır. MIRU-VNTR tiplendirme yönteminde 12, 15 ve 25 MIRU lokusunu içeren çalışmalar yapılmaktadır. Bugün için yaygın olarak kabul gören görüş 15 lokuslu MIRU-VNTR yönteminin ayrım gücünün yeterli olduğudur. Bu yöntem; IS*6110* kopya sayısı düşük olan suşların ayrımında IS*6110*-RFLP'den daha yüksek, kopya sayısı fazla olan suşların ayrımında ise IS*6110*-RFLP 'ye benzer sonuçlar vermektedir (7, 17).

MIRU-VNTR yöntemi ile Malatya (142) ve Zonguldak (25) illerinden yapılan iki ayrı çalışmanın bulgularına göre ülkemizdeki "MIRU-VNTR-International-Type" (MIT)'lerinin dağılımı şöyle özetlenebilir: Malatya'daki suşlar arasından toplam 42 MIT saptanmıştır. MIT310 en fazla (%16.2) saptanan MIRU tipi olup, bunu sırasıyla MIT43 (%8.4), MIT194 (%5.6), MIT8 (%4.9) ve diğerleri izlemektedir. MIT'lerin ST41 içerisindeki dağılımına bakıldığında ise MIT310, %57.6; MIT194, % 24.2; MIT195, %6.1 oranında bulunmuştur (30). Zonguldak'taki MIRU çalışması ST41 içinde yer alan 25 suşu kapsamaktadır ve bu suşlar arasında MIT'lerin dağılımı sırasıyla; MIT310 (%76), MIT10 (%16), MIT31 (%8)'dir (34). Bu sonuçlara bakıldığında; ülkemizde yaygın olarak gözlenen ST41 (LAM7-Tur)'in, MIT dağılımı açısından diğer ST'lerden daha yüksek oranda MIT310 içerdiği söylenebilir. Ancak bu durumun kesinlik kazanabilmesi için ilave çalışmalara gerek vardır.

Sonuçlar:

1- Türkiye'deki *M. tuberculosis* suşlarının en az dörtte biri düşük sayıda (5) IS*6110* kopya bulundurmaktadır.

2- IS*6110*-RFLP+pTBN12 veya IS*6110*-RFLP+Spoligotiplendirme yöntemlerinin sonuçlarına göre Türkiye'deki tüberküloz hastaları arasındaki kümeleşme oranı %30-50 arasında değişmektedir. Bu iki yönteme MIRU-VNTR eklenmesiyle kümeleşme oranı %22'ye inmektedir. Buradan haraketle üç moleküler tiplendirme yöntemini (spoligotyping, MIRUs ve IS*6110*-RFLP) birlikte kullanmak, kümeleşme ve bulaş oranlarının daha gerçekçi olarak tespit edilmesini sağlamaktadır.

3- Ülkemiz heterojen *M. tuberculosis* populasyonuna sahiptir. Bir yandan dünya genelinde yaygın olarak görülen spoligotipler (ST50, ST53), diğer yandan Türkiye ve birkaç komşu ülkede saptanabilen spoligotipler (ST41 ve ST284), öte yandan

yalnızca ülkemize özel (ST1973, ST2160, ST2136 gibi) tipleri bulundurmaktadır.
4- LAM, Haarlem ve geçici tanımlanmış (ill-defined) T süperfamilyası Türkiye'de saptanan üç major spoligotip familyasıdır. Çalışılan suşların %65-76' sini oluşturmaktadırlar.
5- Asya ülkelerinde yaygınlık gösteren CAS, EAI ve Beijing familyaları ülkemizden yapılan çalışmalarda ya hiç saptanmamış veya çok düşük oranlarda bulunabilmiştir.
6- Ülkemizdeki suşlar arasında en yaygın olarak saptanan "MIRU-VNTR-International-Type"i, MIT310'dur.

KAYNAKLAR

1. WHO. 2006. Global tuberculosis control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report, Geneva.
2. Allix C, P. Supply, M. Fauville-Dufaux. 2004. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unitvariable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis.CID.39:783-9.
3. Çağlar AŞ, Çiçek AM, Özkan S, Çağlar A. Ankara'da akciğer tüberkülozlu hastalarda ilaç direnci. XXIII. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi. 3-5 Nisan 2003, Malatya. s. 90.
4. Durmaz R, Gunal S, Yang Z, Ozerol IH, Cave MD. 2003.Molecular epidemiology of tuberculosis in Turkey. Clin Microbiol Infect. 9:873-7.
5. Ozkara S, Kiliçaslan Z, Özturk F, ve ark. 2002.Bölge verileriyle Türkiye'de Tüberküloz. Toraks Dergisi.3:178-87.
6. Durmaz R, Ozerol IH, Durmaz B, et al. 2003. Primary drug resistance and molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. Microbial Drug Resistance 9:361-6.
7. Gopaul KK, Brown TJ, Gibson AL, Yates MD, Drobniewski FA. 2006. Progression toward an improved DNA amplification-based typing technique in the study of Mycobacterium tuberculosis epidemiology. J. Clin. Microbiol. 44:2492-8.
8. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswrith BN. 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin. Microbiol. Rev. 19(4):658-85.
9. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. 1991.Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism

as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 29: 2578-86.
10.Barnes PF, Yang Z, Preston-Martin S et al. 1997.Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. JAMA. 278:1159-63.
11.Cronin WA, Golub JE, Lathan MJ et al.2002. Molecular epidemiology of tuberculosisin a low- to moderate-incidence state: Are contact investigations enough? Emerg Infect Dis 8:1271-9.
12. Achonu C, Jamieson F, Behr MA, Lillebaek T, Khan K, Gardam M. 2006. Evidence for local transmission and reactivation of tuberculosis in the Toronto Somali community. Scand. J. Infect. Dis. 38:778-81.
13.Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, et al. 2002. Global distribution of Mycobacterium tuberculosis spoligotypes. Emerg. Infect. Dis. 8:1347-9.
14. Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, et al. 2003. Snapshot of Moving and Expanding Clones of Mycobacterium tuberculosis and Their Global Distribution Assessed by Spoligotyping in an International Study. J. Clin. Microbiol. 41:1963-70.
15.Zozio T, Allix C, Günal S et al. 2005.Genotyping of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in two cities of Turkey: description of a new family of genotypes that is phylogeographically specific for Asia Minor. BMC Microbiol.5:44.
16.Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. 2003. Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a users guide. J. Appl. Microbiol. 94:781-91.
17.Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, et al.1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J. Clin. Microbiol. 37:2607-18.
18. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT et al. 1993. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol.31: 406-9.
19. Soini H, Pan X, Amin A. Graviss EA, Siddiqui A, Musser JM. 2000. Characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping. J. Clin. Microbiol. 38:669-76.
20. Sola C, Filliol I, Gutierrez MC, Mokrousov I, Vincent V, Rastogi N. 2001. Spoligotype database of Mycobacterium tuberculosis: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. Emerg. Infect. Dis. 7:390-6.

21. Rastogi N. 2006. Comparison of different methods for molecular typing of Mycobacterium tuberculosis. 6th National Mycobacteria Symposium's book., Turkey. P. 149-50.
22. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, et al. 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98:1901-6.
23.Oelemann MC, Diel R, Vatin V, et al. 2007. Assesment of an optimised Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 45 (3):691-7.
24. Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, et al. 2002. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 40:4561-6.
25.Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 44:4498-510.
26.Supply P, Warren RM, Banuls AL, et al. 2003. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of Mycobacterium tuberculosis in a high tuberculosis incidence area. Mol. Microbiol. 47:529-38.
27.Cavusoğlu C, Durmaz R, Bilgic A, Gunal S. 2004. Genotyping of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from western Turkey. Ann Saudi Med. 24:102-105.
28.Kisa O, Albay A, Baylan O, Tozkoparan E, Acikel CH, Doganci L. 2007. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates at the Military Medical Academy in Ankara, Turkey. Res Microbiol. 158(4):318-23.
30. Durmaz R, Zozio T, Gunal S, et al. Population-Based Molecular Epidemiological Study of Tuberculosis in Malatya, Turkey. In press J Clin Microbiol.
29.Koksalan OK, Kilicaslan Z, Zanlier G, Guzel R, Seber E. 2006. Prevalence of Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis strains in Istanbul. Int J Tuberc Lung Dis. 10(4):469-72.
31. Durmaz R, Zozio T, Gunal S, et al. 2007.Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from different regions of Turkey. Infect Genet Evol. 7(4):513-9.
32. Gencer B, Shinnick TM. 2005.Molecular genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates from Turkey. Am J Infect Dis. 1(1):5-11.

33. Otlu B, Durmaz R, Günal S, Sola C, Zozio T, Rastogi N. Beijing/W and major spoligotype families of Mycobacterium tuberculosis strains isolated from tuberculosis patients in eastern part of Turkey. Un published data.
34. Aktaş E, Zozio T, Beğendik Cömert F, et al. A first insight into the genetic diversity and population structure of Mycobacterium tuberculosis in Zonguldak, Turkey. In Pres Clin Microbiol Infect.
35.Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, et al. 1998. .Molecular fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. J Clin Microbiol. 36(2):486-92.
36.Bauer J, Andersen AB, Kremer K, Miorner H. 1999. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number Mycobacterium tuberculosis complex strains cultured in Denmark. J Clin Microbiol.37(8):2602-6.
37.Wilkinson D, Pillay M, Crump J, Lombard C, Davies GR, Sturm AW. 1997. Molecular epidemiology and transmission dynamics of Mycobacterium tuberculosis in rural Africa. Trop Med Int Health. 2(8):747-53.
38.Torrea G, Levee G, Grimont P, Martin C, Chanteau S, Gicquel B. 1995. Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia.J Clin Microbiol. 33(7):1899-904.
39.Puustinen K, Marjamaki M, Rastogi N, et al. 2003. Characterization of Finnish Mycobacterium tuberculosis isolates by spoligotyping. J Clin Microbiol 41, 1525 28.
40. Farnia P, Masjedi MR, Mirsaeidi M, et al. 2006. Prevalence of Haarlem I and Beijing types of Mycobacterium tuberculosis strains in Iranian and Afghan MDR-TB patients. J.Infect. 53, 331-6.
41.Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. 2006. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. B.M.C. Microbiol. 6:23.
42. Li WM, Wang SM, Li CY, et al. 2005. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in China: a national wide random survey in 2000. Int J Tuberc. Lung Dis. 9;1314-19.
43.Ramazanzadeh R, Fania P, Amirmozafari N, et al. 2006. Comparison between molecular epidemiology, geographical regions and drug resistance in Mycobacterium tuberculosis strains isolated from Iranian and Afghan patients. Chemotherapy. 52:316-20.
44. Sola C, Filliol I, Legrand E et al. 2003. Genotyping of the Mycobacterium tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect Genet.Evol. 3, 125-33.
45. Pfyffer GE, Strassle A, van Gorkum T, et al. 2001. Multidrug-resistant tuberculosis in prison inmates, Azerbaijan. Emerg.Infect.Dis. 7, 855-61.

MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK YÖNTEMLERİN TÜBERKÜLOZDA KULLANIM AMAÇLARI

Yrd. Doç. Dr. Alpaslan ALP
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Tüberküloz günümüzde halen 15 ile 49 yaş arasındaki bireylerde tek bir enfeksiyöz ajanın neden olduğu ölümler arasında, en önde gelen sebep olmaya devam etmektedir. Tüm dünyada ve özellikle gelişmiş ülkelerde 1980 ortalarında başlayan tüberküloz hasta sayılarındaki artış, tüberküloz konusuna ilgiyi artırmış ve bu konuyu önemli bir gündem maddesi haline getirmiştir. Dünyada tüberküloz olgularının artışında dört önemli unsur sıralanmaktadır: (a) hükümetlerin hastalığa gereken önemi vermemeleri sonucunda tüberküloz kontrol sistemleri kötüleşmiş ve hatta birçok yerde kaybolmuştur; (b) kötü yönetilen ya da doğru yaklaşımların uygulanmadığı tüberküloz kontrol programları hastalığın artışı yanında ilaca dirençli tüberküloz olgularının artışına yol açmıştır; (c) tüberküloz ve HIV enfeksiyonunun birlikte olduğu hallerde, HIV enfeksiyonunun endemik olduğu yerlerde tüberküloz patlayıcı artış yapmıştır; (d) nüfus artışı tüberküloz olgularının sayılarında artışa yol açmıştır. Bunlara ek olarak sanayileşmiş ülkelerde göçlerle gelen tüberküloz olguları, o ülkelerdeki önemli artış nedenlerinden olmuştur. Tüberküloz hasta sayılarındaki artışlar ve tüberküloz kontrolü çabalarının yeterince başarı sağlayamaması nedeniyle, Dünya Sağlık Örgütü, 1993 yılında tüberküloz için acil durum ilan etmiştir. 1994 yılında da verem savaşının yeni doğrultusu ortaya çıkmaya başlamıştır. Böylece 1990'lı yıllarda başlayan DGTS (Doğrudan Gözetim Tedavisi Stratejisi) uygulamaları, dünyada hızlı bir şekilde yayılmıştır. Tüberküloz kontrolünde anahtar faktörler hızlı saptama, etkili tedavi ve bulaşı önlemektir. Bulaşın önlenmesi, ulusal tüberkülozla savaş programının önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Bu konuda gerçekleştirilmesi gereken ana faaliyetler, temaslılara, yeni enfekte olanlara ve hastalık gelişme riski yüksek olan diğer topluluk ve kişilere koruyucu ilaç tedavisi vermek şeklinde tanımlanmaktadır. Bulaşın önlenmesi için hastalığın erken dönemde saptanması ve hasta kişinin kontrol altında tutulması gereklidir. Moleküler yöntemlerdeki gelişmeler sonucunda in vitro nükleik asit amplifikasyonu ile klinik örneklerden mikobakteriyel DNA veya RNA'nın saptanması mümkün hale gelmiştir. Bunun yanısıra moleküler

yöntemler, *M. tuberculosis* genomundaki polimorfizmlerin saptanmasıyla klinik izolatların birbirinden ayırtedilmesini ve böylece tüberküloz bulaş yollarının ortaya çıkarılmasını mümkün hale getirmiştir. Bulaş kaynağının ortaya çıkarılması, olası diğer bulaşların önlenmesinde kritik bir öneme sahiptir. Bu aşamada, tüberküloz basilinin genotiplendirmesi, izolatların genetik olarak karşılaştırılmasını ve birbirlerinin aynı olup olmadıklarının anlaşılmasını sağlayarak önemli katkı sağlar.

Bu sebeplerle tüberkülozun moleküler epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalar son yıllarda önemli derecede artmıştır. Günümüzde bu konuyla ilgili PubMed'de bir literatür taraması yapıldığında yaklaşık olarak 1000 civarında yayın olduğu görülmektedir. Bunlar içinde ilk yayın 1991'de, ilk genetik belirteç olan IS*6110*'un tanımlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. İlk çalışmalarda ağırlıklı olarak kullanılan yöntemin IS*6110*-RFLP (restriction length fragment polymorphism) yöntemi olduğu görülürken, günümüze yaklaşıldığında VNTR tabanlı yöntemlerin bunun yerini almaya başladığı dikkati çekmektedir.

Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde ideal bir genotiplendirme yönteminin, istenen sonuçlara ulaşılabilmesini sağlayabilmesi için iki önemli özelliğe sahip olması gerektiği görülmektedir. Bunlardan birincisi, yöntemin standardize edilebilir, tekrarlanabilir olması ve günlük uygulamalarda kullanılabilmesi için ekonomik ve hızlı olmasıdır. Böyle bir yöntemin rutin tüberküloz tanı sürecenin erken bir aşamasına yerleştirilmesi önemli katkılar sağlayacaktır. Bunun gerçekleştirilmesi durumunda, üremiş kültür yerine direkt olarak yayma-pozitif balgam örneklerinin kullanılabildiği yöntemlerin daha avantajlı olacağı düşünülmektedir. İdeal bir genotiplendirme yönteminin sahip olması gereken ikinci önemli özellik, yöntemin izolatlar arasında yeterli derecede ayrım sağlayabilmesidir. Her yöntemin ayırtetme derecesi farklıdır ve bu özellik izolattan izolata farklılık gösterebilir. Bunun yanısıra, bir *M. tuberculosis* izolatı zaman içerisinde mutasyonlarla genetik olarak farklılaştığı için, aynı yöntemin aynı izolattaki ayırtetme yeteneği farklı zamanlarda farklı derecelerde bulunabilir. Tüm bunlardan çıkarılabilecek sonuç, her durum için geçerli olan ideal bir genotiplendirme yönteminin bulunmadığı, izolatın genetik özelliğine göre kullanılması gereken ideal yöntemin değişebileceğidir.

Tüberküloz moleküler epidemiyolojisinin çalışılmasında, 1.35 kb'lık insersiyon dizisi IS*6110*'un RFLP paternlerinin karşılaştırılması önemli faydalar sağlamıştır. IS*6110 M. tuberculosis* kompleksi için özgüldür, ancak çok az sayıda *M. tuberculosis*

kompleksi izolatında bulunmayabilir. IS*6110* genom içinde çoğalabilir ve genomun farklı bölgelerine kendisini entegre edebilir veya bulunduğu geneom bölgesinden çıkabilir. Bu nedenle zaman içerisinde IS*6110*'un genom içerisindeki dağılımı tamamen rastlantısal olarak farklılıklar gösterebilir. Bir popülasyon içinde tüberküloza neden olan suşların IS*6110*-RFLP paternlerinin karşılaştırılması, eş izolatların bulunduğu kümeleri ortaya çıkararak, hastalar arası bulaşların izlenmesine olanak tanımaktadır. Son yıllarda genotiplendirme amacıyla geliştirilen yeni ve güvenilir bir yöntem, spoligotiplendirme yöntemidir. Bu yöntem, *M. tuberculosis* kromozomunun 36 bç'lik "direct repeat" (DR) bölgesindeki dizi farklılıklarının gösterilmesine dayanır. Farklı izolatlar birbirinden, bu dizilerin sayısı ile ve pozitif-negatif hibridizasyon sinyal paternleri ile ayrılırlar. Bunun yanısıra 40-100 bç uzunluğundaki "mycobacterial interspersed repetitive units" (MIRU) adı verilen diziler, *M. tuberculosis* genomu boyunca, intergenik bölgelerde bulunurlar.

Moleküler epidemiyolojik yöntemlerin uygulanmasıyla elde edilecek sonuçlar, bir hastanın etken izolatı nereden ve kimden aldığını aydınlatabilir. Bulaş hikayesinin aydınlatılması, yeni tüberküloz olgularının ortaya çıkmasının önlenmesinde önemli olabilir. Yakın zamanda enfekte olmuş kişilerde tüberküloz gelişme riskinin, daha eski dönemlerde enfekte olmuş kişilere oranla sekiz kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. CDC tarafından gerçekleştirilen bir çalışma sonucunda, A.B.D.'nde yayma-pozitif bir tüberküloz hastasının ortalama olarak 6 yakın temas hikayesi olduğu ve bunların %36'sının tüberkülozla sonuçlandığı belirlenmiştir. Bu oran yüksek riskli popülasyonlarda çok daha yüksek olacaktır. Bu nedenle bir tüberküloz hastasıyla temas öyküsü bulunan kişilerin taranması, yeni olguların erken dönemde yakalanması açısından önemlidir. Moleküler epidemiyolojik yöntemlerin geliştirilmesiyle, hasta izolatlarının aynı olup olmadığı anlaşılabilmektedir. Moleküler yöntemler geliştirilmeden önce eş *M. tuberculosis* izolatlarını belirleyebilmek için ilaç duyarlılık paternlerine bakılmakta ve faj tiplendirmesi gibi sınırlı değere sahip yöntemler kullanılmaktaydı. Moleküler genotiplendirme çalışmaları, tüberküloz salgınlarının belirlenmesinde de büyük öneme sahiptir. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla sadece aile içindeki veya yakın çevredeki bulaşların değil, kişisel veya coğrafik olarak bağlantılı diğer bulaşların ortaya çıkarılması da mümkündür. Literatürde bu konuda yapılmış çok sayıda yayın mevcuttur. Bu çalışmalardan bir tanesinde, San Francisco'da bir tüberküloz olgusunun iki yıllık bir süreç içerisinde saptanan tüberküloz olgularının

%6'sına hastalığı bulaştırdığı moleküler epidemiyolojik yöntemlerle kanıtlanmıştır. Bir başka çarpıcı çalışmada, HIV ile enfekte hastaların bakıldığı bir merkezde, bir tüberküloz olgusundan enfekte olma oranının %50 (15/30) olduğu ve bunların %73'ünde 106 gün içinde tüberküloz geliştiği moleküler epidemiyolojik yöntemlerle kanıtlanmıştır.

Bir tüberküloz olgusunun, bilinen başka bir olgu ile temas sonucunda oluşup oluşmadığının anlaşılması, moleküler epidemiyolojik yöntemlerle mümkündür. Bu işlem ancak üremiş bir kültürden yapılabildiği için, tanısal değeri bulunmamakla birlikte, önemli epidemiyolojik faydalar sağlayabilmektedir. CDC, temaslı kişilerin araştırılmasında moleküler epidemiyolojik yöntemlerin kullanımında iki yaklaşımın uygulanabileceğini belirtmektedir. Birinci yaklaşım, şüpheli olgulardan izole edilen suşların eş olup olmadıklarının anlaşılmasına yönelik olarak testlerin uygulanmasıdır. İki izolatın eş bulunması durumunda bir bulaştan söz edilebilir, ancak yine de o popülasyondaki prevalansın yüksek olması durumunda ihtiyatla karar verilmelidir. Çeşitli çalışmalarda, indeks olgu ve temas eden olgu olarak tanımlanan eş izolat oranının %70 civarında olduğu ortaya konmuştur. CDC'nin önerdiği ikinci yaklaşımda ise genotiplendirme, şüphe edilmeyen bulaşların saptanması için kullanılmaktadır. Bu uygulamada bütün izolatlar genotiplendirilmekte ve yeni saptanan her genotip, öceki tüm bilinen genotiplerle karşılaştırılmaktadır. Böylece olası tüm eş izolatların yakalanması mümkün olmaktadır.

Ancak dikkat edilmesi gereken nokta, iki hasta izolatında birbirine eş paternlerin bulunmasının, bu iki hastanın birinden diğerine tüberküloz bulaşı olduğunun kesin kanıtı olmayacağıdır. "Hastadan hastaya bulaş" olduğu sonucuna varılabilmesi için moleküler epidemiyolojik veriler mutlaka klasik epidemiyolojik bulgularla desteklenmelidir. Klasik epidemiyolojik bulguların hastadan hastaya bulaşı desteklememesi durumunda, moleküler epidemiyolojik yöntemlerle saptanan eş izolatlar için farklı gerekçeler bulunabileceği unutulmamalıdır. Bu gerekçeler şöyle sıralanabilir: 1) Bazı popülasyonlarda belli suşlar daha fazla sıklıkla bulunurlar. Bu durumda birbiriyle hiç ilişkisi olmayan bireylerde aynı anda aynı genotipteki suşla hastalık başlayabilir. Böyle bir durumda, suşların ilaç duyarlılık paternlerine de bakılmalıdır. 2) Yaşlı hastalarda reaktivasyon olgularında yalancı kümeler (pseudoclusters) görülebilir. Hastalık yeni bir bulaş ile değil, eskiden alınmış yaygın bir suş ile oluşturulmuş olabilir. 3) Laboratuvar işlemleri sırasında kontaminasyon olguları olasılık dahilindedir ve literatürde mevcuttur.

Moleküler epidemiyolojik yöntemler tüberküloz laboratuvar çalışmaları sırasında bir kontaminasyon olup olmadığının anlaşılmasında vazgeçilmez yöntemlerdir. Gelişmiş ülkelerde laboratuvar kontaminasyonuyla oluşan "pozitif" sonuç oranı tüm pozitif kültürlerin %3-5'ini oluşturmaktadır. Bu durum gereksiz yere hastanede yatış süresinin uzamasına, gereksiz ilaç kullanımına ve yan etkilere maruz kalınmasına yol açmaktadır. Tüm bunlar hasta başına maliyetin önemli derecelerde artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle şüpheli kontaminasyon olgularında, iyi ayırtetme gücüne sahip, hızlı ve ekonomik moleküler epidemiyolojik yöntemlerin kullanılmasıyla önemli katkılar sağlanabileceği düşünülmektedir. Ulusal tüberkülozla savaş programının başarıya ulaşabilmesi için hastalık kontrol önlemleri, hem genel popülasyon hem de yüksek risk grubu popülasyonunda tüberküloz bulaş paternlerinin ortaya çıkarılmasıyla şekillendirilmelidir. Mevcut durumda ülkemizde bir tüberküloz hastasının ortalama kaç sağlam kişiye hastalık bulaştırdığına dair somut bir bilgi yoktur. Ayrıca belli bir *M. tuberculosis* suşunun ortalama kaç kişiyi enfekte ettiği de bilinmemektedir. Ülkemizde kaç farklı *M. tuberculosis* genotipi olduğu da bilinmezler arasındadır. Tüm bunlar hakkında bilgi edinilmesi, mevcut koruyucu önlemlerin etkinliği hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır. Eğer bir bölgede çok sayıda hastada aynı *M. tuberculosis* genotipi saptanıyorsa, o bölgedeki koruyucu hizmetlerin yeniden gözden geçirilerek artırılması gerektiği sonucuna varılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Behr M, Hopewell P, Paz A, et al: Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998; 158: 465-469.
2. Burgos MV, Pym AS: Molecular epidemiology of tuberculosis. Eur Respir J, 2002; 20: Suppl. 36, 54s-65s.
3. Chin DP, Crane CM, Diul MY, et al: Spread of *Mycobacterium tuberculosis* in a community implementing recommended elements of tuberculosis control. JAMA, 2000; 283: 2968-2974.
4. Crawford JT: Genotyping in contact investigations: a CDC perspective. Int J Tuberc Lung Dis, 2003; 7: S453-S457.
5. Daley CL, Kawamura LM: The role of molecular epidemiology in contact investigations: a US perspective. Int J Tuberc Lung Dis, 2003; 7: S458-S462.

6. Enarson DA, Chretien J: Epidemiology of respiratory infectious diseases. Curr Opin Pulm Med, 1999; 5: 128-135.
7. Marks SM, Taylor Z, Qualls NL, et al: Outcomes of contact investigations of infectious tuberculosis patients. Am J Respir Crit Care Med, 2000; 162: 2033-2038.
8. McNabb SJN, Kammerer JS, Hickey AC, et al. Added epidemiologic value to tuberculosis prevention and control of the investigation of clustered genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Am J Epidemiol, 2004; 160: 589-597.
9. Miller AC, Sharnprapai S, Suruki R, et al: Impact of genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* on public health practice in Massachusetts. Emerg Infect Dis, 2002; 8: 1285-1289.
10. Murray M, Nardell E: Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. Bulletin of the World Health Organisation 2002, 80 (6): 477-482.
11. Murray M: Sampling bias in the molecular epidemiology of tuberculosis. Emerg Infect Dis, 2002; 8: 363-369.
12. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H: Türkiye'de tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, Ankara, 2003.
13. Prodinger WM: Molecular epidemiology of tuberculosis: toy or tool? A review of the literature and examples from Central Europe. Middle Europ J Med, 2007; 3-4: 80-89.
Sterling TR, Thompson D, Stanley RL, et al: A multi-state outbreak of tuberculosis among members of a highly mobile social network: implications for tuberculosis elimination. Int J Tuberc Lung Dis, 2000; 4: 1066-1073.

GENOTİPLENDİRMEDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Doç. Dr. Cengiz Çavuşoğlu
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Moleküler biyolojideki gelişmeler enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalardaki seçenekleri artırmıştır. Bakteri kökenlerini birbirinden ayırmanın en olası yolu hiç kuşkusuz kökenlerin tüm genomunun dizi analizinin yapılmasıdır. Bununla birlikte tüm genomun dizi analazi oldukça pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir; bu nedenle epidemiyolojik çalışmalarda genomun yalnız belli bir bölümü değerlendirilmektedir. Moleküler yöntemlerle çalışılan kökenlere spesifik genetik profiller "fingerprint" (parmak izi) olarak adlandırılmaktadır. İki veya daha fazla kökende aynı ya da çok benzer parmak izi saptandığında bu kökenler aynı "cluster" (küme) olarak tanımlanmaktadır. Farklı hastalardan elde edilen aynı kümeye ait izolatların çok büyük bir olasılıkla epidemiyolojik olarak bağlantılı olduğu ve hastalar arasında kısa bir süre önce olmuş bulaşmayı gösterdiği söylenebilir (1).

Moleküler tiplendirme yöntemlerindeki gelişmeler, tüberkülozun epidemiyolojisinin anlaşılmasını kolaylaştırmış, salgınların tanımlanmasına ve hastalığın toplum içinde yayılımının anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Moleküler tiplendirme yöntemleri epidemiyolojik tüberküloz çalışmalarında, salgınların saptanmasında, reenfeksiyon ve reaktivasyon ayrımında, laboratuvarlardaki çapraz kontaminasyonların gösterilmesinde kullanılmaktadır (2-4).

Bakteriyel veya ökaryotik olsun tüm canlıların genomlarında tekrarlayan (*repetitive*) DNA dizileri bulunur. Bakteriyel genomda bulunan tekrar dizileri genomda dağılmış tekrarlar (*interspersed repeats*) veya ardışık tekrarlayan (*tandem repeats*) diziler şeklinde olabilmektedir. Dağılmış tekrarlayan diziler dendiğinde birkaç kopyası bulunabilen tutunma dizileri (*insertion sequence; IS*) gibi mobil genetik elemanlar, duplike olmuş genler ya da kısa tekrar dizileri (*short sequence repeats*) anlaşılır. Ardışık olarak tekrar eden dizilerin tekrar sayıları kökenler arasında değişkenlik gösterebildiğinden bunlar değişken sayıda tekrarlayan (*variable number tandem repeat*; VNTR) diziler olarak da adlandırılmaktadır. Tekrarlayan DNA dizileri çeşitli mekanizmalarla genetik varyasyonu artırabilirler. Bu nedenle tekrarlayan DNA dizileri epidemiyolojik ve evrimsel ilişkilerin değerlendirilmesinde önemli bir göstergedir (5-8). Aşağıda tüberküloz epidemiyolojisinde en sık

kullanlan genotiplendirme yöntemleri IS*6110*-*"restriction fragment length polymorphism"* (IS*6110*-RFLP), *"mycobacterial interspersed repetitive unit"*-VNTR (MIRU-VNTR) ve spoligotiplermeden söz edilecektir.

IS *6110*-RFLP

M.tuberculosis genomunun yaklaşık %4'ü IS ve profajlardan oluşmaktadır. *M.tuberculosis* H37Rv genomunda günümüze kadar 56 tane bütün ya da kesintiye uğramış IS elemanı tanımlanmıştır. Organizasyonları, dizi benzerlikleri ve terminal tekrarları dikkate alınarak bu 56 IS elemanı IS*3*, IS*5*, IS*21*, IS*30*, IS*110*, IS*256*, IS*605*(1535) ve IS*L3* ailelerine ayrılmıştır. *M.tuberculosis*'de IS elemanları-nın horizontal gen transferi yoluyla ve büyük bir olasılıkla bu organizma yaşam şeklini bir toprak saprofitinden zorunlu bir patojene değiştirmeden önce kazanıldığı düşünülmektedir. IS3 ailesinin üyesi olan 1365 bp'lik IS*6110* elemanı genomda en bol bulunan, üzerinde en çok çalışılmış ve hakkında en çok şey bilinen IS elemanıdır. Bu elemanın kopya sayısı *M.tuberculosis* H37Rv'de 16 iken farklı kökenlerde 0 ile >25 arasında değişmekte ve kromozomun farklı bölgelerine yerleşmiş şekilde bulun-maktadır. IS*6110* aracılı genetik değişkenlik doğada ya da hastalık sırasında aktif olarak gerçekleş-mektedir. IS*6110* sayısıyla virülans arasında bir ilişki olduğunu gösteren bir kanıt yoktur. (5-8).

IS*6110* elemanını temel alan restriksiyon fragmanları oldukça polimorfik ve epidemiyolojik çalışmalara izin vercek kadar da stabildir (9, 10). Günümüzde kullanılan yöntemler içinde en yüksek ayrım gücüne sahip olanı, *IS6110*-RFLP yöntemidir. Beş ve daha fazla sayıda *IS6110* kopya sayısı içeren izolatlarda, *IS6110*-RFLP referans yöntemdir. Buna karşın bol miktarda genomik DNA gerektirmesi, emek yoğun olması, tiplendirmede gecikmelere yol açmakta ve rutin uygulamasını güçleştirmektedir. Ayrıca *IS6110* kopya sayısının beşten az olduğu izolatlarda yöntemin ayrım gücü zayıftır (11, 12). Bu nedenlerden dolayı sonucun kısa sürede alınmasının önemli olduğu salgınların araştırılmasında problem oluşturmaktadır (1).

IS*6110*-RFLP yönteminde genomik DNA PvuII restriksiyon enzimiyle kesilerek IS*6110* elamanları 0.9-10 bp'lik DNA fragmanlarına ayrılır. Oluşan restriksiyon fragmanları jel elektroforez ile ayrılarak IS*6110* probu ile saptanır. Parmak izlerinin değerlendirilmesi halen deneyim gerektiren ve yanlış değerlendirmlere açık bir yöntemdir. Tam olarak otomatize edilmiş bir profil karşılaştırma yöntemi de henüz geliştirilememiştir (1). Tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü oldukça yüksek olan bu yöntem son on yıldır *M. tuberculosis*'de köken tanımlanması için kullanılan

standart referans bir yöntemdir. Bu yöntem sıklıkla daha hızlı olan PCR-temelli yöntemlerin doğrulanması amacıyla kullanılmaktadır. IS*6110*-RFLP için bol miktarda (5-10 mg) DNA'ya ihtiyaç vardır ve bu nedenle birkaç haftalık kültürler gereklidir. Yöntemin hazırlık aşamaları çok uzun ve zahmetlidir ve bu nedenle hızlı sonuç vermek gerektiğinde uygun değildir. IS*6110*-RFLP sonuçlarının dijital ya da "binary" (ikili) olmaması bir diğer dezavantajıdır. Bununla birlikte bu sorun dünyada yaygın veri tabanı oluşturularak çözülmüştür (1).

SPOLİGOTİPLEME

M.tuberculosis'in genomunda kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; CRISPR) bulunmaktadır. Bu lokuslar 27-37 bp'den oluşan direkt tekrarlar ve bu tekrarların arasına yerleşmiş yaklaşık aynı boyutta tekrar etmeyen dizilerden oluşur. *M.tuberculosis*'in genomunda bulunan ve 37-41 bp'lik tekrarlamayan boşluk dizileriyle ayrılan 36 bp'lik DR (*direct repeat*)'ler bu tip CRISPR dizilerine örnek olarak verilebilir. Bu dizilerin görevleri tam olarak bilinmemektedir. Buna karşın bu lokuslar bakterinin *in-vitro* üremesi için gerekli değildir. DR lokuslarını temel alan spoligotiplerme bu tekrar bölgeleri arasındaki dizilerin varlığını veya yokluğunu temel alır. Bu DR'lerin tekrar sayısı 10-50 arasında değişmektedir (5, 7). Spoligotipleme kromozomal DR lokusundaki polimorfizmi temel alan bir yöntemdir. Lokus ilk olarak *Mycobacterium bovis* BCG'de tanımlanmıştır ve çok sayıda "direct variable repeats" (direkt değişken tekrarlar, DVRs)lerden oluşur. Her DVR 36-bp'lik bir direkt tekrar (DR) ve "spacer" adı verilen benzer boyutta (37 ile 41 bp arasında değişen) tekrar etmeyen kısa bir diziden oluşur (1). DR'lerin arasında 94 farklı spacer tanımlanmasına karşın (1, 13) diğer spacerlar daha fazla ilave bilgi vermedikleri için rutin uygulamada bu spacerlardan yalnız 43 tanesi kullanılmaktadır. "Spacer"ların ortadan kalkmasının en önemli nedeni delesyonlardır. Zaman içinde seyrek olarak aynı kökende delesyonlar olabilmesine karşın spoligotip paternleri oldukça stabildir (1).

"DR bölgesi" olarak bilinen ve IS*6110* elamanının tercih etiği polimorfik lokusun *M.tuberculosis* kompleks'in epidemiyolojik çalışmalarında kullanılması ilk olarak Groenen tarafından önerildi. Daha sonra Kamerbeek ve ark. (12) bu bölgeyi analiz ederek spoligotipleme olarak bilinen yöntemi gündeme getirdiler. Spoligotiplemede DR dizisini hedef alan primerler kullanılarak yapılan PCR ile işlemi ile DR'ler arasındaki farklı "spacer"ler amplifiye edilir. Amplifiye

"spacer"lardan oluşan PCR ürünü daha sonra 43 farklı "spacer" probları ile hibridize edilir. "Spacer"lar ikili kodla negatif ya da pozitif şeklinde sunulur. Hibridize olmuş spacerin varlığı pozitif sinyal, "spacer" hibridizasyonunun olmaması ise negatif sinyal olarak değerlendirilir (12).

Spoligotiplerme basittir ve tekrarlanabilirliği yüksektir, ayrıca ikili formatda sonuç alınabilmesi veri tabanı kullanılması için avantajdır; bu nedenle tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşın ne yazik ki ayırım kapasitesi düşük veya orta düzeydedir. Bu nedenle altta yatan epidemiyolojik kümeleri saptamak amacıyla ikincil bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Belirli bir durumda yerel sonuçların dünyadaki spoligotipleme veri tabanlarıyla karşılaştırılması tüberküloz basilinin popülasyon genetiği hakkında bilgi sağlayabilir (1).

MIRU-VNTR

M.tuberculosis'de çok farklı işlevler gören (lipid, nükleik asit ve protein biosentezi veya degradasyonu; enerji üretimi; veya düzenleyici işlevler) gen bölgeleri arasında dağılmış MIRU olarak adlandırılan dağılmış tekrar bölgeleri tanımlanmıştır. MIRU'lar bir çok tekrar dizisinin aksine aşikar bir palindromik bir yapı göstermezler. *M.tuberculosis* H37Rv'nin genomunda genler ve operonlar arasında 41 ayrı lokusda boyutları 46-101 bp arasında değişen MIRU'lar bulunur. MIRU'lar sıklıkla ardışık tekrarlar şeklinde olduklarından muhtemelen replikasyon sırasında "*slippage*" olayları ile tekrar kopya sayılarını değiştirerek polimorfizm oluştrurlar. Bu değişkenlik bazı MIRU tiplerinde gösterilmiş ve 15 farklı lokusta yerleşmiş MIRU'lar (MIRU-4, MIRU-10, MIRU-16, MIRU-26, MIRU-31, MIRU-40, Mtub04, ETR C, ETR A, Mtub30, Mtub39, QUB-4156, QUB-11b, Mtub21, QUB-26) bugün *M.tuberculosis*'in köken tiplendirmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (5, 7, 14). MIRU-VNTR tiplendirme olarak adlandırılan bu yöntemde; genom boyunca dağılmış olan ve izolatlar arasında polimorfizim gösteren MIRU lokuslarındaki tekrarlayan 52-77 nükleotid uzunlukta ve her biri identik veya yakın identik birimlerin kopya sayılarına göre, izolatların tiplendirilmesi yapılmaktadır. (15). MIRU-VNTR ile genom içinde dağılmış MIRU lokusları özgül primerlerlerle amplifiye edilmekte ve oluşan fragmanların uzunlukları değerlendirilerek her bir lokus için ardışık tekrarların sayısı belirlenmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda MIRU-VNTR'nin ayrım gücünün spoligotiplemeden daha iyi olduğu gösterilmiştir (16-18). Yüksek ayırım gücü, kısa sürede tamamlanması, laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilir dijital sonuçlar vermesi, MIRU-VNTR yöntemini fazla sayıdaki *M. tuberculosis* izolatlarının tiplendirilmesinde cazip bir teknik haline getirmektedir.

Bu yöntem otomatize edilebilir, tekrarlanabilir ve *M. tuberculosis* kompleks izolatları için duyarlı ve özgüldür. Tüberkülozun küresel epidemiyolojik sürveyansı için uygundur. Otomatik bir dizi analiz cihazı olan laboratuvarlar için metodun kurulması oldukça kolaydır (19). *IS6110* RFLP ve Spoligotipleme ile karşılaştırıldığında, MIRU-VNTR tiplendirme yöntemi daha fazla ayırt edici profil oluşturmaktadır (20). Son çalışmalarda MIRU-VNTR tiplendirme yönteminin *M. tuberculosis*'in moleküler epidemiyolojisinin küresel analizinde referans yöntem olarak kullanılabileceği (21) ve geniş kentsel alanlardaki *M. tuberculosis* izolatlarının genetik farklılıklarını çalışmak için faydalı bir ilk adım yöntemi olabileceği belirtilmektedir (22).

Supply ve ark. (14) tarafından yapılan çalışmada klasik olarak kullanılan MIRU 04, MIRU 26, MIRU 40, MIRU 10, MIRU 16, MIRU 31 lokuslarına Mtub04, ETR C, ETR A, Mtub30, Mtub39, QUB-4156, QUB-11b, Mtub21 ve QUB-26 lokuslarının eklenmesiyle oluşan 15 lokusun kullanılmasının MIRU-VNTR'nin ayrım gücünde önemli artışlar sağladığı, bu lokusların epidemiyolojik çalışmalar için yeterli olduğu bildirilmekte, sözü edilen 15 lokusa ek olarak MIRU 2, MIRU 23, MIRU 39, MIRU 20, MIRU 24, MIRU 27 ve Mtub29 lokuslarının kullanılmasıyla elde edilen toplam 24 lokusun ise filogenetik çalışmalar için kullanılması önerilmektedir. *IS6110*-RFLP'nin halen *M.tuberculosis*'in genotiplendirmesinde altın standart olmasına karşın yeni tanımlanan 15 lokusun kullanılmasıyla MIRU-VNTR yönteminin *IS6110*-RFLP düzeyinde ayrım gücüne ulaştığı bildirilmektedir (14). Isı döngü cihazının bulunduğu moleküler tekniklerin uygulanması için minimal koşulların bulunduğu laboratuvarlarda uygulanabilmesi, çalışma için az miktarda DNA'nın yeterli olması, kopya sayısının beşten daha az olduğu durumlarda ayrım gücünün *IS6110*-RFLP'den daha iyi olması ve sonuçların rakamsal olarak ifade edilmesi MIRU-VNTR'nin *IS6110*-RFLP'ye üstünlükleridir (23-25). Ayrıca sonuçlar rakamsal olarak ifade edilebildiğinden MIRU-VNTR verilerin merkezi bir veri tabanında saklanmasına ve web sitesi aracığıyla paylaşılabilmesine uygun bir yöntemdir (23).

KAYNAKLAR

1. Moström P, Gordon M, Sola C et al. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 694-704

2. Benjamin WH Jr, Lok KH, Harris R, et al. Identification of a contaminating *Mycobacterium tuberculosis* strain with a transposition of an I*S6110* insertion element resulting in an altered spoligotype. J Clin Microbiol 2001, 37: 1092–1096.

3. van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Intern Med 2001, 249:1–26

4. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. N Engl J Med 1994, 330: 1710–1716.

5. Gordon SV, Supply P. Repetitive DNA in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR Jr; eds. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. 1st ed. Washington, DC: ASM Press; 2005: 191-202.

6. Mc Adam RA, Quan S, Guilhot C. Mycobacterial Transposons and Their Applications. In: Hatfull GF, Jacobs WR Jr; eds. Molecular Genetics of Mycobacteria. 1st ed. Washington, DC: ASM Press; 2000: 69-84.

7. Cave MD Murray M, Nardell E. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR Jr; eds. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. 1st ed. Washington, DC: ASM Press; 2005: 33-46.

8. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al Genom Organization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Molecular Genetics of Mycobacteria. 1st ed. Washington, DC: ASM Press; 2000: 323-353.

9. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin microbiol 1991; 29: 2578-86.

10. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers of strain differantiation and epidemiology of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 1987-95.

11. Goyal M, Saunders NA, van Embden JDA, Young DB, Shaw RJ. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and I*S6110* restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 1997, 35: 647–651.

12. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol 1997, 35: 907–914.

13. Beggs ML, Cave MD, Marlowe C et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction. J Clin Microbiol 1996; 34: 2985-9.

14. Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2006, 44: 4498–4510.

15. Sola C, Filliol I, Legrand E, et al. Genotyping of the Mycobacterium tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infection, Genetics and Evoluation 2003; 3:125-33.

16. Barlow REL, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH, Dickens A, Qamer S, Hawkey PM. Comparison of variable number tandem repeat and I*S6110*-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number I*S6110 Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol 2001, 39: 2453–2457.

17. Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. J Clin Microbiol 2000, 38: 2520–2524.

18. Gopaul KK, Brown TJ, Gibson AL, Yates MD, Drobniewski FA. Progression toward an improved DNA amplification-based typing technique in the study of *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology. J Clin Microbiol. 2006, 44: 2492-2498.

19. Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT. Variable-number tandem repeat typing of mycobacterium tuberculosis isolates with low copy numbers of *IS6110* by using mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol 2002; 40: 1592-602.

20. Tazi L, Baghdadi JE, Lesjean S, et al. Genetic diversity and population structure of Mycobacterium tuberculosis in Casablanca, a Moroccan city with high incidence of tuberculosis. J Clin Microbiol 2004; 42:461-6.

21. Sun YJ, Bellamy R, Lee AS, et al. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Singapore. J Clin Microbiol. 2004; 42:1986-93.

22. Banu S, Gordon SV, Palmer S, et al. Genotypic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Bangladesh and Prevalence of the Beijing Strain. J Clin Microbiol 2004;42: 674-82.

23. Mazars E, Lesjean S, Banuls A, et al. High-resolution minisatellitebased typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98: 1901–1906.

24. Kremer K, Arnold C, Cataldi A, et al. Discriminatory Power and Reproducibility of Novel DNA Typing Methods for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. J Clin Microbiol 2005, 43: 5628–5638

25. van Deutekom H, Supply P, de Haas PEW,et al. Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Analysis, a More Accurate Method for Identifying Epidemiological Links between Patients with Tuberculosis, J Clin Microbiol 2005, 43: 4473–4479.

MİKOBAKTERİYOLOJİ LABORATUVARINDA KALİTE ve İÇ KALİTE DENETİMİ

Prof. Dr. Tanıl Kocagöz
Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D., İstanbul

Tüberküloz kontrol ve "Doğrudan Gözetim altında Tedavi" programlarının en önemli parçalarından birisi tüberküloz tanı laboratuvarıdır. Buna karşın genelde birçok ülkede programın en fazla göz ardı edilen kısmıdır. Oysa kaliteli bir tüberküloz laboratuvar hizmetinin tüberkülozun kontrolundaki önemi yadsınamaz.

Tüberküloz laboratuvarında kalite denetimi yapılabilmesi için öncelikle laboratuvar istenen kalite standartlarını tutturabilecek şekilde düzenlenmeli ve varsa eksikler giderilmelidir. Bu yapılmadan uygulanan testlerde istenen sürdürülebilir standart kalitenin sağlanması olanaklı değildir. Tanı incelemelerinin kalitesini, sadece incelemelerde kullanılan malzemeler değil, laboratuvarın alt yapısı, çalışanların eğitimi ve çalışma yöntemleri etkiler. Kalite iç ve dış denetiminde başarılı olabilmek için tüm bu unsurların birlikte ele alınması gereklidir. İç kalite denetiminde başarılı olamayan bir laboratuvarın dış kalite denetiminde başarılı olması olanaklı değildir.

Başarılı bir kalite kontrol için uygun eğitim almış, ilgili ve istekli çalışanlar, mantığa uygun pratik yöntemlerin kullanılması, hataları en aza indirme istekliliği ve çalışanlar arasında etkin iletişim çok önemlidir.

Kalite kontrolu, laboratuvarın düzenlenmesi, laboratuvar araçları, örneklerin toplanması ve taşınması, örneklerin işlenmesi, ayraçlar ve yöntemler, sonuçların iletilmesi konularında gerçekleştirilmelidir. Tüm bunlar düzenlenirken ülke gerçekleri dikkate alınmalıdır.

Laboratuvarın düzenlenmesi:

1- Laboratuvar kapıları çalışma sırasında sürekli kapalı olmalıdır. Laboratuvar

aletleri iş akışına uygun bir şekilde yerleştirilmelidir. Çalışma alanları toz tutmamalı, günde en az bir kez, uygun bir dezenfektan ile silinmelidir.
2- Yöntemler yazılı olmalı ve kolayca bakılabilecek şekilde saklanmalıdır. Değişiklik yapılacak olursa, değşikliğin kimin tarafından yapıldığı kaydedilmeli ve laboratuvar yöneticisine onaylatılmalıdır. Değişiklikten ilgili çalışanlar haberdar edilmelidir.
3- Kullanılan yöntemler bilimsel çalışmalarla etkinliği kanıtlanmış yöntemler olmalıdır.
4- Bütün kayıtlar en az iki yıl saklanmalıdır.

Laboratuvar araçları:

1- Üreticinin bildirdiği kalite ve özelliklerde olmalıdır.
2- Kullanım yönergeleri kolay ulaşılabilir bir dosyada bulunmalıdır.
3- Düzenli bakımları yapılmalı ve kayıtları tutulmalıdır.

İnceleme istem kağıtları

Sadece yetkili kişiler tarafından yapılmış yazılı istemler için örnek incelemesi yapılmalıdır. Sözlü istemler kesinlikle kabul edilmemelidir.

İstem kağıtlarının tam olarak doldurulması sağlanmalıdır. Tam olarak ne olduğu anlaşılmayan örnekler kabul edilmemelidir.

İstem kağıtları örneklerden ayrı tutulmalı ve üzerlerine örnek bulaştırılmamalıdır. Üzerine örnek bulaşmış istem kağıtları yakılarak veya otoklav ile sterilize edilmelidir.

Örneğin kalitesi gözle değerlendirilmelidir. Balgam değil de daha çok tükürük görünümünde olan örnekler not edilmeli ve sonuç verirken, "örnek tükürük görünümünde, negatif sonuç bu dikkate alınarak yorumlanmalıdır" notu eklenmelidir. Kolaylık olması açısından bu tür bir kaşe yaptırılıp, uygunsuz örneklere bu basılabilir.

Parçalanmış, akan kapta gelen örnek olursa, bu otoklavda sterilize edilmeli ve yeni örnek istenmelidir.

Örnek geldiğinde, laboratuvara geliş saati not edilmeli ve sonuç ile birlikte bildirilmelidir.

Örnek işleme:

Yöntem:

Örneklere uygulanan dekontaminasyon ve konsantrasyon yönteminin etkinliği mikroskopla inceleme ve kültür sonuçlarını etkileyen en önemli unsurdur. Kubica tarafından tanımlanan NaOH-NALC dekontaminasyon ve konsantrasyon yönteminin, modifiye Petroff yöntemine göre üstün olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Ancak Petroff yönteminin uygulaması daha kolay olduğu için bu yöntem yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir. Petroff yöntemi kullanılıyorsa kalitenin arttırılması için Kubica yöntemine geçilmesi yararlı olur.

Laboratuvar araçları ve uygulamalar:

Kubica yöntemi kullanılırken örnekler arası çapraz bulaşın ve çevreden bulaşın önlenmesi için çözeltilerin her örnek için ayrı şişede hazırlanması veya bu şekilde hazırlanmış kitlerin kullanılması önemlidir. Örnek işleme düzey II biyogüvenlik kabinlerinde yapılmalıdır. Bu kabinler hem çalışanı tüberküloz basillerinden hem de örneği kontaminasyondan korur. Bu kabinlerin hava çekiş gücü ve yönü düzenli olarak hem laboratuvar çalışanları, hem de servis veren firma tarafından yapılmalıdır.

Örnek işlemede kullanılan santrifüj ideal olarak 3000g'lik santrifüj gücüne ulaşmalı, godeleri salıncak şeklinde açılabilir ve kapaklı olmalı, tüpleri tam kavrayan gözenekleri bulunmalıdır. Santrifüj soğutmalı olmalıdır. NaOH çözeltisindeki mikobakteriler ısıtıldıkları zaman önemli ölçüde ölebilmektedir. Sıcaklığın santrifüj sırasında 20°C'den 30°C'ye çıkmasının bile canlı mikobakterilerin önemli ölçüde kaybedilmesine neden olduğu gösterilmiştir.

Mikobakteriler santrifüj edildikten sonra üst sıvı iyice süzülerek dökülmeli, çözelti içerisindeki NaOH'den iyice arındırılmalıdır. Bu pH'nın iyi ayarlanması için çok önemlidir. İyi ayarlanan pH hem daha fazla mikobakteri soyutlanmasını sağlar, hem de besiyerlerinde üremeyi hızlandırır.

Mikroskopla inceleme:

Laboratuvar düzenlemesi:

Laboratuvarda ideal olan mikroskopla inceleme yapılan alanın ayrı bir oda olmasıdır. Bu odada dört ayrı bölüm bulunmalıdır:
1- Örneklerin odaya alındığı, kayıt edildiği, saklandığı ve sonuçların işlendiği alan
2- Örneklerin işlendiği, preparat hazırlandığı alan
3- Preparatların boyandığı alan
4- Preparatların mikroskopla incelendiği alan

Mikroskop bakımı:

• Günlük olarak objektif, kondansatör ve preparat konan yer kağıt veya gazlı bez ile silinmelidir. İş bitince mikroskobun lambası söndürülmeli ve örtüsü kapatılmalıdır.
• Aylık olarak hava püskürterek (pastör pipetine takılan bir lastik balon ile yapılabilir), sonra ıslak bezle silerek tozlar ışık kaynağı üzerinden, okülerlerden ve diğer kısımlardan temizlenmelidir.
• Altı ayda bir mikroskobun servis veren profesyonel kişi tarafından bakımının yapılması uygundur.

Çözeltiler ve boyalar:

• Her türlü boya ve ayraçların üzerinde son kullanma tarihleri bulunmalı, son kullanma tarihi geçen ürünler mutlaka laboratuvardan uzaklaştırılmalıdır.
• Malzemeler 6 aylık yetecek kadar alınmalı ve depolanmalıdır. Fazla malzeme depolanıp eskitilmemelidir.

Preparatların boyanması ve incelenmesi:

• Preparatlar bir seferde 12'yi geçmeyecek şekilde gruplar halinde boyanmalıdır.
• Özellikle günde 10'dan daha az preparata bakılıyorsa her gün pozitif ve negatif kontrol preparatlar da hazırlanıp incelenmelidir.
• Kontrol preparatlar hasta örneklerinden önce incelenmelidir. Pozitif kontrolda

kırmızı basillerin bulunmaması, negatif kontrolda ise kırmızı basillerin bulunması işlemde bir sorun olduğunu gösterir. Arka alanın da tam olarak dekolore olmaması ve kırmızımsı görünmesi de kalite sorununa işaret eder.

Kültür

Örnek işleme:

Dekontaminasyon ve konsantrasyon için Kubica yöntemi kullanılıyorsa ve bunun için çözeltiler laboratuvarda hazırlanıyorsa, özellikle fosfat tamponu hem çapraz hem de çevreden kontaminasyona neden olabilmektedir. Fosfat tamponu olanaklı ise her örnek için ayrı şişede hazırlanmalı, büyük şişelerde hazırlanıyorsa birden fazla kullanımda havadan kontaminasyon olmamasına ve çapraz kontaminasyonun engellenmesi için tampon eklenirken tüplerin ağzına dokunulmamasına büyük özen gösterilmelidir. Çözeltilerden düzenli olarak kanlı agar gibi zengin bir besiyerine ekim yapılarak kontaminasyon bulunup bulunmadığı izlenmelidir. Hazır dekontaminasyon konsantrasyon kiti kullanılması tüm bu sakıncaları ortadan kaldırabilmektedir.

Kültür besiyerleri:

Bir örnek için iki çeşit kültür besiyeri kullanılması kaliteyi arttırabilmektedir. Bunlar iki farklı katı besiyeri (Löwenstein Jensen, Middlebrook Agar, TK SLC vb.) veya bir katı bir sıvı (Middlebrook broth vb.) besiyeri olabilir. Önemli olan besiyerinin katı veya sıvı olması değil farklı besiyerleri olmasıdır. Örnek öncelikle birden fazla tüpe ekildiği için, az sayıda ARB bulunan örneklerden mikobakteri soyutlama şansı artar. Bir besiyerinde üreme koşulları bazı kökenler için daha elverişli olabilir. Bir besiyeri başka organizmalarla kontamine olduğunda diğeri seçicilik farklılığı dolayısı ile kontamine olmadan kalabilir.

Ekim ve izleme:

Dekontaminasyon sonrası ekim için steril pastör pipetleri veya steril uçlu otomatik pipetler kullanılabilir. Dikkat edilmesi gereken noktalar şunlardır:
• Tüplerin üzerine hasta ve örnek isimleri, numaraları önceden, ekim sırasında

rahatça görülebilecek şekilde, yazılmalıdır. Ekim yaparken örnek tüpleri ile kültür tüpleri üzerindeki isim ve numaraların aynı olmasına çok dikkat edilmelidir.
• Ekim yapılan tüpler kabinde ekim yapılmayı bekleyen tüplerden ayrı bir yere konmalıdır.
• Tüplere 0.2 ila 0.5ml işlenmiş örnek ekilmelidir.
• Ekim yapılan katı besiyerleri en az 24 saat yatık durumda bekletilmelidir.
• Ekim yapıldıktan sonra 72 saat içerisinde kontaminasyon varlığı açısından besiyerleri değerlendirilmelidir.
• Katı besiyerlerin koloni oluşumu en az 3 günlük aralıklarla düzenli olarak yapılmalıdır.

Sonuçların iletilmesi ve izlenmesi

• Mikroskobi ve kültür sonuçları çıkar çıkmaz en kısa zamanda iletilmelidir. Bu süre mikroskobi için örnek alındıktan sonra 24 saati geçmemelidir.
• Mikroskobi ve kültür sonuçları haftalık ve aylık olarak değerlendirmeli alışılmışın dışında pozitiflik ve nagatiflik oranlarında artışların varlığı araştırılmalıdır.
• Birbirini izleyen farklı hastalara ait örneklerde arka arkaya çok sayıda ARB pozitif bulunursa örnek hazırlama sırasında çapraz bulaş olup olmadığı araştırılmalıdır.
• Mikroskopla inceleme ve kültür sonuçları karşılaştırılmalı, beklenmeyen bir uyumsuzluk varsa sorunun nedeni araştırılmalıdır. Kültürün duyarlılığı daha iyi olduğu için mikroskop sonuçlarına göre %10-20 gibi bir oranda kültürler daha fazla pozitif sonuç elde edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Center for Disease Control. Laboratory Manual for Acid-fast Microscopy. 2nd ed. US Department of Health, Education and Welfare, Smithwick, USA, 1979.
2. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis Bacteriology. 2nd ed. Organization and Practice. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997.
3. Fadda G, Virgilio GD, Mantellini P, Piva P, Sertoli M. The organization of laboratory services for a tuberculosis control programme. *JPMA* 1988; 38(7): 187-193.
4. Ipuge YAI, Rieder HL, Enarson DA. The yield of acid-fast bacilli from serial smears in routine microscopy laboratories in rural Tanzania. *Transactions of the*

Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1996; 90: 258-261.
5. Kubica GP. Correlation of acid-fast staining methods with culture results for mycobacteria. *Bull Int Union Tuberc* 1980; 55(3-4): 117-124.
6. Lipsky BA, Gates J, Tenover FC, Plorde JJ. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. *Reviews of Infectious Diseases* 1984; 6(2): 214-222.
7. Mitchison DA. Examination of sputum by smear and culture in case-finding. *Bull Int Union Tuberc* 1968; 41: 139-147.
8. PAHO/WHO Advisory Committee on Tuberculosis Bacteriology. Manual of Technical Standards and Procedures for Tuberculosis Bacteriology. Part I: The specimen microscopic examination. Pan American Health Organization, Martinez, Argentina, 1988.

AKREDİTASYON VE DIŞ KALİTE KONTROL UYGULAMALARI

Doç. Dr. Nuran ESEN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İzmir

Laboratuvar akreditasyonu; klinik laboratuvarın ürettiği kaliteli hizmetin, standartları sağlayabilecek yeterlilikte olduğu, bağımsız kurumlardan gelen denetçiler tarafından incelenmesi ve belgelendirilmesidir. Burada söz konusu olan hizmet sadece yapılan analizleri değil, analiz öncesi ve sonrasında yer alan tüm süreçleri de kapsamaktadır. Denetim ve belgelendirme işlemlerini yapan kuruluşlar ise, standardize edilmiş uluslararası kabul gören ölçütleri uygulamaktadırlar. Günümüzde bir zorunluluk olmayan ve gönüllülük esasına dayanan laboratuvar akreditasyonu ile laboratuvarların yeterliliği resmi olarak kabul edilmekte ve saygınlıkları artmaktadır.

Laboratuvarların akreditasyonunda ilk olarak kullanılan ISO 17025, deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının standartlarını kapsamaktadır. Tıbbi laboratuvarların akreditasyonu ise; ISO 15189 veya Joint Commission (JCAHO veya JCI) esaslı sistemlerle oluşturulmaktadır. Birçok ortak özellikleri olan iki sistem de aynı amaç doğrultusunda çalışmaktadır.

ISO 15189'da öncelikle mevcut durum belirlenir. Ardından yönetsel ve teknik gereklilikler yerine getirilir. Gereklilikler; yönetsel ve teknik başlıkları altında 23 standart madde ile belirtilmektedir. Yönetsel gereklilikler arasında; organizasyon, danışmanlık hizmetleri, şikayetlerin çözümü, uygunsuzlukların saptanması ve kontrolü, düzeltici ve önleyici etkinlikler, sürekli iyileştirmeler ve iç denetimlerle ilgili ayrıntılar bulunmaktadır. Ayrıca "yaptığını yaz, yazdığını yap" anlayışı ile hazırlanan belgeler, kayıtlar ve bunların kontrolleri de yer almaktadır. Teknik gereklilikler arasında ise; personel, çevresel koşullar, laboratuvar ekipmanları, sonuçların raporlanması, preanalitik, analitik ve postanalitik süreçlerle ilgili prosedürler yer almaktadır. Akredite olduktan sonra da sürekli iyileştirmeler başlığında belirtildiği gibi her zaman daha iyiye ve ileriye gitmek mümkündür. Değişim objektif ölçütlerle belirlenmektedir.

Kalite sistemi uygulamalarına başlamadan önce laboratuvar ve çalışanların mevcut

durumu değerlendirilmelidir. Çoğu zaman çalışanların katılımını sağlamak en zorlu uğraş olmaktadır. Kaliteli iş üretmek, kaliteli hizmet vermek ve bir kalite sistemine girmek ancak nitelikli insan gücü ile mümkün olabilir. Akreditasyon sürecinin başarılı olabilmesi; tüm çalışanların bu hedefi paylaşması, bilgilenmesi ve sürece katılmasıyla mümkün olmaktadır.

Laboratuvarlarda yapılan testlerde, temel kontrol yöntemi olan iç kalite kontrol programları yanı sıra dış kalite kontrol programları da uygulanmalıdır. Akreditasyon sürecindeki kalite kontrol programları, verilen hizmetin kalitesini arttırmayı amaçlamaktadır. Tüberküloz laboratuvarında yapılan testlerden; mikroskopi, kültür, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi veya mikobakteri türlerinin tanımlanması, antibiyotik duyarlılığı ve moleküler yöntemlere yönelik dış kalite kontrol programları bulunmaktadır. Yaygın olarak kullanılan *"United Kingdom National External Quality Assessment Service"* (UK NEQAS) programında; mikroskopi, kültür, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin tanımlanması ve moleküler tanı yöntemlerine yönelik paneller bulunmaktadır. *"Accu Test DigitalPT"* programında; mikroskopi, kültür, antibiyotik duyarlılığı, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi ve mikobakteri türlerinin tanımlanmasına yönelik paneller bulunmaktadır. Moleküler tanıda yaygın olarak tercih edilen "" (QCMD) programında ise tüberküloz tanısına yönelik moleküler paneller bulunmaktadır. QCMD tüberküloz panelinde yer alan örneklerin yarısı simüle BOS, diğer yarısı ise simüle balgam olarak belirtilmekte, moleküler test öncesinde örnek türüne uygun işlemler de uygulanmaktadır. Dış kalite kontrol programları gün geçtikçe yaygınlaşmakta, ulusal ve uluslararası yeni programlar oluşturulmaktadır. Ancak kullanılacak programın seçiminde; programı hazırlayan merkezlerin güvenilirliği, katılımcı sayısı, örnek sayısı, örnek çeşitliliği ve örnek içeriği göz önünde bulundurulmalıdır.

Akreditasyon süreci; tüm çalışanlarda kaliteli hizmet üretme bilincinin gelişmesine önemli katkılar sağlamaktadır. Hasta ve klinisyen hekimler gibi hizmet verilenlerin gereksinimleri karşılanırken, çalışanlar için de uygun, güvenli ve bilimsel ortam sağlamaktadır.

TÜBERKÜLOZ KONTROL PROGRAMLARI VE DGTS

Prof. Dr. Zeki KILIÇASLAN
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul

Tüberküloz erişkinler arasında enfeksiyonlara bağlı ölümlerin en sık sebebidir. Halen dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri TB basili ile enfekte durumdadır. Her yıl yaklaşık 8.8 milyon insan TB hastalığına yakalanmakta ve 1.5milyon insan TB nedeni ile ölmektedir.(1)Tüberkülozun dünyanın bir çok yerinde ihmal edilmesi ve bazı bölgelerde kontrolden çıkması nedeni ile Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)1993 yılında için acil durum ilan etmiş ve tüberküloz kontrol programında gerekli düzeltmelerin yapılmasını önermiştir.

Tüberküloz kontrolünde güncel sorunlar

Son yıllarda dünya ölçüsünde Tüberküloz insidansında artışını başlıca dört nedeni bulunmaktadır.**Bunlardan birincisi; sağlık politikalarında tüberküloza yeterli önemini verilmemesidir.** Bu nedenle tüberküloz olgularında kür oranları düşmüş olguların önemli bir kısmı kronik basil çıkartır durumda toplumda enfeksiyonun yayılmasına yol açmışlardır.Düzensiz ve yetersiz tedavi sonucu ek olarak tedavisi çok daha zor ve pahalı dirençli Tüberküloz gelişimine ve bu suşların yayılmasına neden olmuştur.

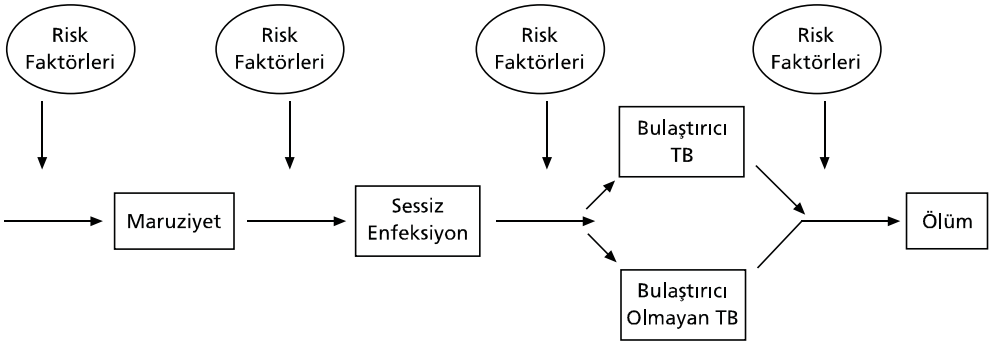
İkinci neden ise, demografik değişimlerdir. Nüfusun artması ile TB enfeksiyon ve hastalığı için önemli risk oluşturan genç erişkin sayısı artmış bu da TB insidansında yükselişe neden olmuştur. **Üçüncü neden HIV/AIDS salgınıdır.** HIV salgını özellikle Afrika ve Asya da tüberkülozda durumun kötüleşmesine yol açmıştır.Normal koşullarda TB enfekte kişilerde

TB hastası olma riski ömür buyu % 10 civarında iken HIV ile enfekte kişilerde bu risk yılda % 5-10 ' a çıkmıştır. Bu nedenle genç erişkinlerde Tüberküloz insidansı artmış, ek olarak tüberküloza olgularında ölüm oranları artmıştır. **Dördüncü neden sosyoekonomik değişimlerdir.**

TÜBERKÜLOZ KONTROLÜ

Aşağıdaki şemada (Şekil 1) tüberkülozun epidemiolojik modeli gösterilmiştir.Burada görülebileceği gibi TB basiline maruziyet, enfeksiyon, hastalık ve ölüm aşamalarının

tümü için belirli risk faktörleri vardır.Tüberküloz kontrolü,bu risk faktörlerinin azaltılması, yok edilmesi yoluyla sonunda hastalığın elimine edilmesini amaçlayan etkinliklerin bütününden oluşur.



Şekil 1. Patogeneze dayalı TB Epidemioloji Modeli (2)

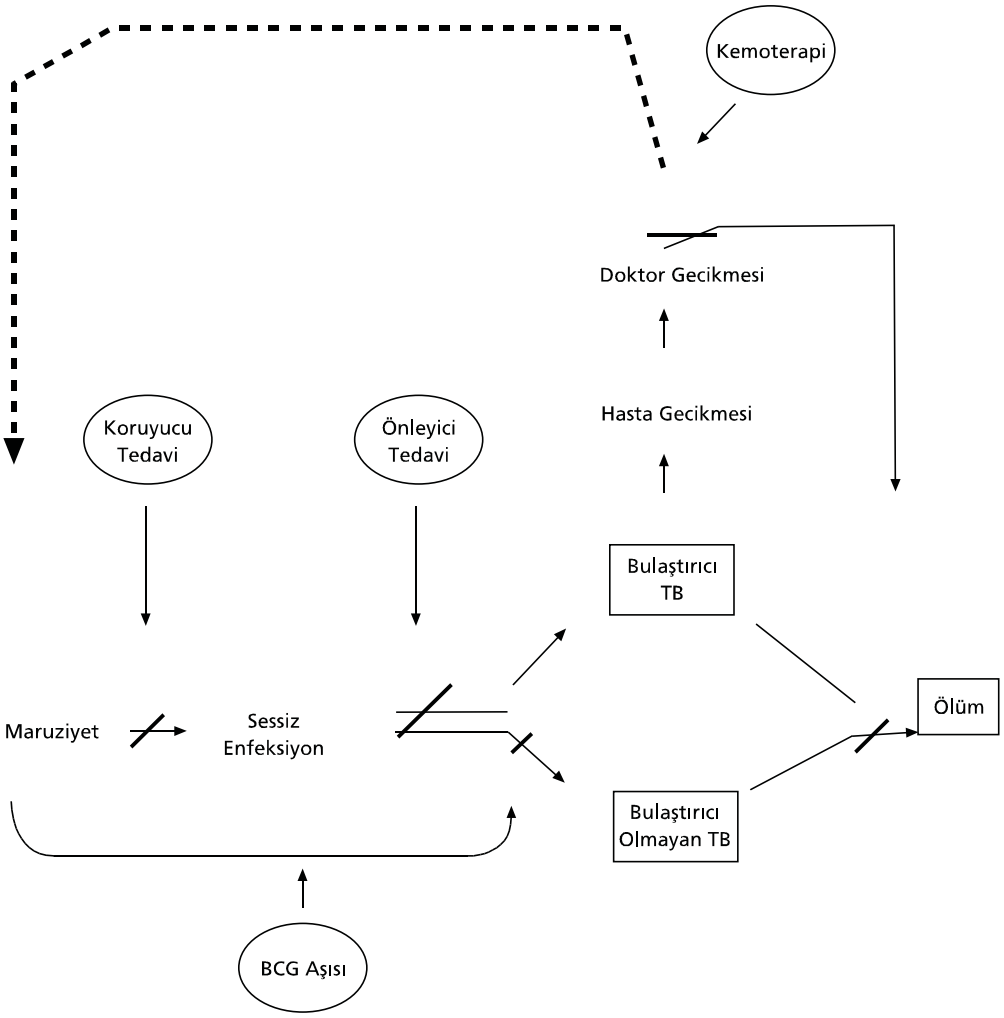
Tüberküloz Kontrolünün Amaçları

Tüberküloz kontrolünde en önemli stratejik amaç *M. tuberculosis* ile enfeksiyon insidansını azaltmaktır. Bunu sağlamak için özellikle tüm tüberküloz hastalarının yaklaşık % 50' sini oluşturan ARB (+) olguların saptanması ve hızla tedavi edilerek bulaştırıcı olmaktan çıkarılmaları gereklidir.

Tüberküloz kontrolünün ikinci stratejik amacı ise TB enfeksiyon prevelansını azaltmaktır. *M. tuberculosis* enfeksiyondan sonra uzun yıllar sessiz olarak vücutta kalabildiği ve herhangi bir dönemde hastalığa neden olabildiği için bu sessiz enfeksiyonlu kişilerin oluşturduğu havuzun azaltılması gelecekteki hastaların oluşmasını engelleyecektir.Bu amaca erişilmesi için latent (sessiz) enfeksiyonlu kişilere uygulanacak koruyucu tedavi tüberkülozun tümüyle elimine edilmesine hizmet eder.

Tüberküloz Kontrolünün Araçları

Aşağıdaki şekilde (Şekil 2) Tüberkülozun doğal gidişi ve hastalığın kontrolü açısından müdahale edilebilecek alanlar ve araçlar gösterilmiştir.



Şekil 2. Tüberküloz kontrolü için uygulamalar modeli (2).

Olguların bulunması

Bulaştırıcı TB olgularının erken tanısı enfeksiyonun yayılmasını önlemede çok önemlidir. Esas olarak pasif ve aktif olmak üzere iki tür olgu bulma yöntemi kullanılmaktadır.

Pasif olgu bulma yöntemi semptomla başvuran tüberküloz şüpheli kişilerde bakteriyolojik ve radyolojik kontrolle yapılmaktadır. Aktif olgu bulma yöntemlerine göre çok daha ucuz olan bu yöntemin tam olarak etkili olması için halk sağlığı eğitimleri ile halkın uyarılması, birinci basamak sağlık hizmetlerinin yeterli ve TB kontrol programına entegre olması ve başvuruların gecikmemesi için tüberküloz

tedavi ve takibinin ücretsiz olarak sağlanması gereklidir. Dünya Sağlık Örgütü ve IUATLD (International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases) az ve orta gelişmiş ülkeler için asıl olgu bulma yöntemi olarak pasif yöntemi önermektedir.

Bu yaklaşımda öncelikle üzerinde durulacak olan bulaştırıcı yayma pozitif olgular olduğu için TB kontrol programları için tanıda vazgeçilemez olan uygulama **kalite denetimi olan bir mikroskopi ağına** sahip olmalarıdır.

Aktif olgu bulma yöntemi ise bulaştırıcı kişilerin bulunması amacıyla hastalığın çok daha yaygın olduğu özellikle1950-1975 yılları arasında bir çok gelişmiş ülkede kullanılan kitlesel mikrofilm taramaları şeklinde uygulamıştır. Bu gün bu yöntem hastaların yakın temaslıları, mahkumlar, yüksek TB riskli ülkelerden gelen göçmenler gibi yüksek risk grupları için önerilmektedir.

Olguların tedavi ve takibi

Özellikle balgamlarında fazla sayıda basil olan yayma mikroskopisi (+) akciğer tüberkülozlu olgular en bulaştırıcıdır ve bunların tanı ve tedavisi tüberküloz kontrolünün esasını oluşturmaktadır. Yayma pozitif olgular kabaca tüm tüberküloz hastalarının yarısını oluşturur, tüberküloz enfeksiyon insidansını azaltabilmek tüberküloz basili saçan bu hastaların mümkün olduğu kadar erken tanı ve etkili tedavisi gereklidir. Bu olguların tedavisiz kalmaları hastalığın buluşmasının devam etmesine ve ölümlere yol açmaktadır.Öte yandan bu olguların yetersiz ve/veya eksik tedavisi hastaların bulaştırıcılıklarının devam etmesi yanında ilaç direnci gelişmesine neden olur..Bu açıdan bu olguların düzenli tedavisinin **"doğrudan gözetimli tedavi"** yöntemiyle garanti altına alınması ve düzgün işleyen bir **kayıt ve raporlama sistemi** ile TB kontrol programının performansının izlenmesi gereklidir.

BCG Aşılaması

BCG aşılamasından beklenen tüberküloz enfeksiyonundan hastalığa ilerleme riskini azaltmasıdır. BCG' nin etkinliği üzerindeki tartışmalar halen sürmektedir. Birçok çalışma BCG nin özellikle primer tüberkülozun menenjit ve milier tüberküloz gibi formlarından korunmayı sağladığı yönündedir. BCG' nin menenjit tüberküloz ve milier tüberküloz için koruyuculuğu yapılan meta analizlerde randomize kontrollü çalışmalarda %86, olgu kontrol çalışmalarda ise % 75 olarak bildirilmiştir(3). BCG' nin akciğer tüberkülozunda koruyucu etkisinin ise % 50

civarında olduğu bilinmektedir (4). BCG'nin bulaştırıcı akciğer tüberkülozu riskini önemli ölçüde azaltmaması toplumda tüberkülozun yayılmasının önlenmesindeki etkinliğini sınırlı hale getirmektedir. Bununla birlikte halen DSÖ ve IUATLD tüberküloz enfeksiyon riskinin belirli ölçüde olduğu ülke ve toplum gruplarında BCG aşışını önermektedirler.IUATLD bir toplumda zorunlu BCG uygulamalarının kaldırılması için aşağıdaki koşulların sağlanmış olmasını önermektedir;1)Son üç yıl boyunca ortalama yıllık yayma pozitif olgu insidansı 100.000 de 5 dan aşağı olmalıdır.2)Son 5 yıl boyunca 5 yaş altı çocuklarda ortalama yıllık tüberküloz menenjit bildirim hızı genel popülasyonda on milyonda birden az olmalıdır veya 3)yıllık tüberküloz enfeksiyon riski % 0.1 den az olmalıdır (5).

Koruyucu ve önleyici tedavi

Profilaktik(koruyucu) tedavi kavramı kişinin TB enfeksiyonundan korunması için ilaçla tedavisini öngörürken, preventif (önleyici) tedavi TB basili ile enfekte olan kişilerin hastalanma risklerini azaltmak için tedavi anlamına gelmektedir. Tüberküloz kontrol programlarında bu konudaki esas uygulama preventif (önleyici) tedavidir.Önleyici tedavi konusunu sağlıklı değerlendirmek PPD pozitifliği ile tanı konulan TB enfeksiyonunun **"yeni TB enfeksiyonu -**iki yıl öncesine kadar PPD negatif olarak bilinen kişide veya aktif akciğer tüberkülozlu kişinin ev içi temaslısında saptanan PPD pozitifliği) " ve **"sesiz TB enfeksiyonu-**diğer PPD pozitif kişiler" olarak iki bölümde ela alınması ile mümkündür.Bu iki grup arasında TB hastalığına yakalanma riski açısından çok fark vardır (6).Yeni enfekte kişiler değişik yaş gruplarında farklılık göstermekle beraber sessiz enfekte kişilere göre yaklaşık 2-3 kat daha fazla hastalığa yakalanırlar. Preventif tedavinin etkinliği hastalanma riskinin düzeyi yanında verilen tedavinin etkinliği ve ilaç uyumuna bağlı olarak değişir. Yeni enfekte olduğu tespit edilenlerde INH ile yapılan önleyici tedavinin etkinliği % 90' aşabilirken, temaslılardaki etkinliği 70-80 civarındadır (2).

Dünya Sağlık Örgütü ve IUATLD, TB kontrol programı açısından koruyucu/önleyici tedaviyi esas olarak hastalık insidansının çok azaldığı ve eliminasyon fazına geçmekte olan gelişmiş ülkelerde önermektedir. Hastalık insidansı yüksek ülkelerde ise preventif tedavi daha çok bulaştırıcı olgular ile yakın temaslı olan çocuklar ve immünsepresif kişilerde önerilmektedir.

Yönetimsel Aktiviteler

TB kontrolünde **planlama, uygulama, denetleme ve değerlendirme** başlıklı dört temel yönetimsel aktivite vardır (B).Bunlardan birincisi TB kontrolü için altyapısı, amacı, hedefleri, metotları ve zaman çizelgesi açık olarak ortaya konulmuş olan bir **planlama**nın yapılmasıdır.Yapılan planın beklenen şekilde **uygulanması** yani amaçlarına ulaşması ve ihtiyaç halinde yeniden gözden geçirilmesi gereklidir. **Denetim** aktivitelerinin uygulamaya paralel olarak fakat farklı kişiler tarafından yerine getirilmesi kontrol programı için çok önemlidir.Programın belirlenen amaç ve hedeflere ulaşıp ulaşmadığı bağımsız, bilimsel ve periyodik aralıklarla **değerlendirilmelidir.** Doğal olarak gerek tüm TB program uygulayıcı ve denetimcileri gerekse bütün birinci basmak sağlık birimlerini hedefleyen eğitim etkinlikleri TB kontrolü için ayrı bir önem taşır.

DOĞRUDAN GÖZETİMLİ TEDAVİ STRATEJİSİ (DGTS)

DOTS (DİRECTLY OBSERVED TREAKMENT-SHORT COURSE – DGTS) Dünya Sağlık Örgütü ve TB ile ilgili uluslararası kuruluşlar tarafında TB kontrolü için önerilen stratejik yaklaşımdır. Esas yönelimi bulaştırıcı olguların erken tanısı ve tedavisi yoluyla enfeksiyonun yayılmasının önlenmesi olan bu yaklaşımın beş temel ilkesi vardır;

1. Balgamında TB basili bulunan yayma (+) bulaştırıcı hastaların erken tanısı için semptomlu hastalarda mikroskopik muayeneye dayalı tanı yöntemlerinin uygulanması.
2. Bulaştırıcı hastaların en azından yoğun tedavi döneminde doğrudan gözetimli olarak standart rejimlerle tedavilerinin sağlanması.
3. Düzenli kesintisiz ilaç sağlanması.
4. Standart kayıt ve raporla sisteminin yürütülmesi.
5. Bütün bu programın düzenli yürütülmesi için ulusal ve yerel düzeyde siyasi kararlılık
sağlanması.

Bu stratejik paket uygulama ilk önce Dr. Karel Styblo liderliğinde IUATLD tarafından Tanzanya başta olmak üzere Afrika ülkelerinde uygulanmıştır. DSÖ bu yaklaşımı 1991 de desteklemeye başlamış ve 1994 de DOTS olarak adlandırılacak yaklaşımı benimsediğini açıkça deklare etmiştir. DOTS stratejisinde daha sonra bazı

değişiklikler gerçekleştirilmiştir. Temel stratejiye ek olarak Çok İlaca Dirençli Tüberküloz (ÇİD-TB) hastalarının tedavisini ve HIV ile ilişkili TB sorunlarını ele ala yaklaşım DOTS-Plus olarak adlandırılmıştır. Ayrıca düşük TB insidanslı ülkelerde seçilmiş yüksek TB riskli gruplarda aktif olgu bulma yöntemlerinin uygulanması,rutin ilaç duyarlılık testi ve sessiz TB enfeksiyonu tedavisinin yaygınlaştırılması önerilmiştir.2005 yılında DOTS uygulayan ülke sayısı 187 olmuştur. DSÖ Tüberküloz kontrolünde son yıllarda uluslararası tüm kuruluşlarla birlikte oluşturulan "Stop TB" ortaklığı ile birlikte DOTS stratejisini daha da geliştirerek dünya çapında TB kontrolü için **Stop TB Stratejisi**'ni oluşturmuştur (8).

Stop TB Stratejisinin hedefleri;

• 2005 yılında beklenen olguların en az % 70'ini bulmak ve bunların en az % 85' ini kür etmek (% 84 ile kür hedefine ulaşılmasına rağmen beklenen oluların dünya ölçüsünde ancak % 60'ı yakalanabilmiştir (1))

• 2005 yılında 1990 yılına göre TB prevelansını ve TB'a bağlı ölümleri % 50 azaltmak, yani prevelansı 100.000 de 155'e ölümü 100.000 de 14' e indirmek.

• 2050 yılında Dünyada TB eliminasyonunu sağlamak (< 1/1.000.000)

Stop TB Stratejisinin Temel Uygulamaları:

1. Yüksek kalitede DOTS uygulamaların yaygınlaştırılması.
2. HIV/TB, ÇİD-TB ve diğer sorunlara yönelmek.
3. Genel sağlık sistemlerinin güçlendirilmense katkı yapmak.
4. Kamu ve özel tüm hizmet sunucular ile işbirliği sağlanması.
5. TB hastalarının ve toplumun TB kontrol programlarına aktif katılımının desteklenmesi.
6. Yeni tanı araçları, ilaç ve aşı geliştirilmesi için araştırmalar yapılması.

Stop TB Stratejisinin hedeflerini ulaşabilmesi için bütün ülkeler çapında yoksulluğun azaltılması, sağlık sistemlerinin güçlendirilmesi ve TB kontrolü için yeni mali kaynakların yaratılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. WHO/HTM/TB/2007.

2. Rieder. HL. Interventions for Tuberculosis control and elimination. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2002

3. Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. Int J Epidemiol 1993; 22: 1154-8.

4. Aronson NE, Santosham M, Comstock GW, Howard RS, MoultonLH, Rhoades ER, et al. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: a 60-year follow-up study. JAMA 2004; 291: 2086-91.

5. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease .Criteria for discontinuation of vaccination programmes using Bacille Calmette-Guerin (BCG) in countries with low prevalence of tuberculosis. Tuber Lung Dis .1994; 75:179-180.

6. Horsburgh, Jr. C. R. Priorities for the Treatment of Latent Tuberculosis Infection in the United States. N Engl J Med 2004; 350:2060-7.

7. Tuberculosis control: A manual on methods and procedures for integrated programs. Washington .Pan American Health Organization, 1986.

8. The Stop TB Partnership and World Health Organization. Global Plan to stop TB 2006-215. Geneva, (WHO/HTM/STB/2006.35).

SAĞLIK ÇALIŞANLARINDA TÜBERKÜLOZ RİSKİ VE KORUNMA ÖNLEMLERİ

Doç. Dr. Mustafa ÖZYURT
GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul

Tüberküloz (TB) mortalite ve morbiditesi yüksek infeksiyon hastalıklarından biridir. Dünya Sağlık Örgütüne(DSÖ) yapılan bildirimler dikkate alındığında tüberkülozun saptanan İnsidansı dünyada 66/100000 olmasına rağmen tahmin edilen gerçek insidansı 141/100000'olarak bildirilmektedir. Ülkemizin 2002 yılına ait bildirimlerinde bu oran 26/100000 olarak kayıtlarda yer almaktadır. Dünyada her yıl ortalama 10-12 milyon yeni tüberküloz olgusu bildirimi yapılmakta olup bunların yaklaşık %95'i gelişmekte olan ülkelerden yapılmakta ve yılda 2-3 milyon insan sadece tüberkülozdan ölmektedir. Yoksulluk ve aşırı nüfus yoğunluğu gibi sosyoekonomik faktörler dahil pek çok unsur TB görülme oranlarındaki artışın nedenleri olarak gösterilmektedir. Vakaların yaklaşık %80'nin en fazla üretken oldukları 15 ile 59 yaşlar arasında hastalığa yakalandıkları gözönünde tutulduğunda tedavi olmamış pulmoner tüberkülozlu her hastanın yılda 10-15 kişiyi enfekte ederek hastalığın ciddi bir halk sağlığı sorunu olmasına yol açabildiği gerçeği göz ardı edilemez.

Ülkemizde gerek hastanede gerekse hastane dışında bakım hizmeti veren sağlık çalışanlarında tüberküloz insidansının yüksek olduğu bildirilmektedir. İlk kez 1940 yıllarında hemşire ve tıp öğrencileri arasında yapılan prospektif çalışmalarla sağlık çalışanlarında tüberküloz riski ortaya konmuş 1950'li yıllarda mesleki risk oluşturduğu konusunda uzlaşma sağlanmış ve günümüzde hastanelerde tüberküloz bulaşı kabul edilmiştir. Sağlık çalışanlarında önemli iş gücü kaybına da yol açabilen bu risk, kurumdan kuruma, hatta aynı sağlık kurumu içerisinde servisler arasında bile önemli değişimler gösterebildiği bildirilmiştir. Riskin büyüklüğü, sağlık kuruluşunun tipine, toplumdaki prevalansına, sağlık hizmetlerinden yararlanan hasta populasyon oranına, sağlık çalışanı meslek grubuna, sağlık çalışanının çalıştığı birime ve TB enfeksiyon kontrol etkinliklerine bağlıdır. CDC tarafından normal populasyona göre TB hastalığı riskinin sağlık çalışanlarında 3.2 kat daha fazla olduğu bildirilmiş olmakla birlikte gelişmekte olan ülkelerde bu oran 2-8 kat olarak raporlamıştır. ABD'lerinde yapılan çalışmalarda bu riskin % 0.1-10

arasında değiştiği, özellikle doktorların topluma göre 3 kat daha fazla risk altında olduğu ve Tüberkülin Deri Testi (TDT) konversiyonunun %0.33-5.5 olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde sağlık kurumlarında tüberküloz salgını bildirilmemiş olmasına karşın hastanelerde sağlık çalışanlarına TB bulaşının araştırıldığı sınırlı sayıda çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların önemli bir kısmı nokta prevalans çalışmaları boyutunda olup bir kısmı TDT konversiyonu çalışmalarına yöneliktir. Ülkemizde yapılan nokta prevalans çalışmalarında sağlık çalışanları için bu risk, 100.000 de 69 ile 670 arasında bildirilmiştir. TB riski yüksek meslek grubu olarak ilk sırada Hemşire ve hastabakıcılar gelmektedir. Doktorlar arasında özellikle Göğüs hastalıkları uzmanları ve dahili birimlerde çalışanlar, Patologlar ve Mikobakteriyoloji Laboratuvar çalışanları ile diğer yardımcı personel daha fazla risk altındadırlar.

Özellikle enfekte kişilerin konuşması, öksürmesi ve hapşırması sırasında yaklaşık 1-5 m büyüklüğündeki *M.tuberculosis* basillerini içeren enfeksiyöz partiküller ortam havasına karışarak çevreye yayılır ve duyarlı kişileri enfekte eder. Öksürük ile ortama yaklaşık 3,500 enfekte damlacık yayılırken, hapşırma anında bu sayı 1 milyon enfeksiyöz partiküle ulaşabilmektedir. Solunum yolu ile alveollere ulaşıp enfeksiyona neden olabilmesi için *M.tuberculosis*'in en düşük enfektif dozu insanlarda < 10 basildir.

Gelişmekte olan ülkelerde TB tanısı sıklıkla büyük kentlerdeki hastanelerde gerçekleşir. Hastane öncesi genellikle ayaktan hasta takibi yapabilen lokal veya bölgesel sağlık merkezleri hastalığın ön tanısında yardımcı olmalarına rağmen hastaların kesin tanı ve tedavisi için sadece referans merkezlerinde hospitalize edilmeleri gerekir. Tanısı hastanede konan bu hastaların oranı genellikle %30 veya daha fazladır. Bu durum hastane ortamında TB infeksiyonuna maruziyet riskinide beraberinde getirmektedir. İnfeksiyona maruz kalan vakaların %25-50'sini, *M.tuberculosis* ile enfekte aktif pulmoner tüberkülozlu hastalarla bir arada bulunan yakınları oluşturur. TB, genellikle bu kişilerde latent olarak seyreder.

TB'un hastaneler ve diğer kapalı alanlarda yayılımına ilişkin epidemiyolojik kanıtlara literatürlerde sıkça rastlanılmaktadır. Sağlık çalışanları için özellikle göğüs hastalıkları hastaneleri önemli bir risk alanıdır. Bu güne kadar yüzey teması ile TB basilinin yayılmını gösteren bir bildirim söz konusu değildir. Hatta bu kapsamda kaynağa yönelik yapılan incelemelerde, ciddi TB epidemilerinde bile hava yolu ile giysiler, mobilyalar, döşemeler ve duvarlara düşen TB basilinin önemli bir tehlike oluşturmadığı gösterilmiştir.

Hastanelerde, TB hastalarına ait bakım ve tedavi ünitelerinde peryodik olarak

yapılması gerekli biyogüvenlik ölçümleri genellikle ihmal edilir. Bu durum *M.tuberculosis'* e bağlı hastane enfeksiyonu gelişme ve yayılma riskini arttırmaktadır. *M. tuberculosis*'in hastane kaynaklı yayılımında kaynak genellikle TB'lu hastadır. Bulaş zinciri genellikle bu hastadan sağlık çalışanına, hastadan hastaya veya sağlık çalışanlarından diğer hastalara geçiş tarzında gözlenir.

TB infeksiyon riski yönünden 1990'lı yıllarda, gelişmiş ve gelişmekte olan bazı ülkelere ait referans ve eğitim hastanelerinde öğrencileride içeren kapsamlı incelemeler yapılmıştır. Bu incelemeler sonucunda sağlık çalışanları arasında hastane kaynaklı TB'un yayılma oranının tıp, hemşirelik ve fizyoterapi öğrencilerinde yüksek olduğu saptanmıştır. Sağlık kurumlarında çalışanlara *M. tuberculosis* bulaşı ile ilgili olarak, bronkoskopi, endotrakeal entübasyon, aspirasyon, diğer respiratuvar prosedürler, açık abse irrigasyonu, otopsi, balgam indüksiyonu ve öksürmeyi tetikleyen aerosol tedavileri kapsayan aerosol oluşturucu prosedürlerin uygulandığı tüberküloz hastaları ile yakın temasın ilişkilendirildiği oldukça yoğun çalışmalar mevcuttur. Hatta bu çalışmaların birçoğunda çoklu ilaç dirençli tüberküloz suşlarının hem diğer hastalara hem de sağlık çalışanlarına bulaştığını gösteren salgınlardan bahsedilmiştir. *M.tuberculosis'in* yayılma riskini azaltmak amacıyla, aktif pulmoner tüberkülozlu veya TB şüpheli hastalara yardımcı olunurken mutlaka bireysel korunma önlemlerine uygun hareket edilmesi, ünitenin uygun havalandırma ve hasta izolasyonuna yönelik yeterli bina donanımına sahip olması gerekmektedir.

HASTANELERDE TB BULAŞ RİSK ALANLARI, KORUNMA VE KONTROL

Sıklıkla TB bulaşına neden olabilecek yüksek risk alanları arasında; Respiratuar izolasyon odaları, Torasik radyoloji odası, Bronkoskopi ve balgam indüksiyon odaları, Pentamidin nebulizasyon odası, Solunum desteği verilen bölümler, Günlük hastane hizmet alanları, Acil servisler, Otopsi odası ve Mikrobiyoloji / mikobakteriyoloji laboratuvarı ilk sıralarda sayılabilir. CDC tarafından, belirlenen yüksek riskli bu alanlarda çalışırken veya aerosol oluşumuna neden olabilecek uygulamalar sırasında korunmak amacıyla önlük ve eldiven kullanımı gibi standart önlemlere ek olarak yüksek düzeyde koruyuculuğa sahip diğer solunum maskeleri (*CDC/NIOSH tarafından sertifikalandırılmış N95, N 99, FFP2 veya FFP3 gibi filtreli maskeler*) ve koruyucu gözlük kullanımını önermektedir.

TB, diş hekimliği çalışma ortamında da önemli bir sorundur. Böyle bir ortamda hastalar, hekim ve yardımcıları ile diğer sağlık çalışanları potansiyel olarak enfekte damlacık ve aerosoller ile TB yönünden risk altındadırlar. Bu durum özellikle diş tedavisi sırasında kullanılan *ultrasonik alet, mikromotor, hava su spreyleri* ve endodontik tedavi sırasında *lazer* kullanımı sonucu meydana gelen saçılmalar ve

bioaerosollerin hekim ve yardımcıları tarafından solunması ile gerçekleşebilir. Tedavi gören hastalarda kullanılan dental aletlerin uygun olmayan temizlik ile etkili olmayan dezenfeksiyon veya sterilizasyon uygulamalarıda diğer hastaları ve uygulayıcıları infeksiyonlara maruz bırakabilmektedir. Bu nedenle TB dahil çapraz enfeksiyonları önlemek için diş hekimliği ile ilgili ideal çalışma kurallarına uyulması, kişisel koruyucu giysi, maske, kep ve gözlük kullanımı gibi standart korunma önlemlerine ait yayınlanmış rehberlere titizlikle riayet, mevcut riski en aza indirmede önemlidir.

Hastaneye gelen ziyaretçilerin TB dahil bir çok solunum yolu enfeksiyonlarına ait patojenlerin kaynağı olabildiği gösterilmiştir. Ziyaretçi kontrolü/taraması, özellikle toplumda kazanılmış enfeksiyonlarla salgın durumlarında ve yüksek riskli hastaların bulunduğu servislerde önemlidir. Ziyaretçilerin önlük, eldiven ya da maske kullanımı literatürde özel olarak incelenmemiştir. Bu ve benzeri önlemler; servislerde hastalık ve hastanın mevcut durumu dikkate alınarak belirlenmektedir.

Hastaların nakli sırasında önerilen standart önlemler dışında TB olguları için ambulans gibi dar alanların ortak paylaşılması söz konusu olduğunda ek önlemler alınması gerekli olabilmektedir. Bu nedenle, hastane ortamında özellikle vakalara ilk hizmetlerin verildiği acil servis kabul ve triaj alanları, poliklinikler ve doktor odaları gibi bölümlerde etkili enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması gerekliliğine işaret edilmektedir. Bu amaçla geliştirilen ve önerilen stratejiye "Solunum Hijyeni/Öksürük Etiketi" adı verilmiş ve standart önlemlere ek olarak enfeksiyon kontrol uygulamalarına dahil edilmesi istenmiştir. Öksürük Etiketi deyimi özellikle *M. tuberculosis* için önerilen kaynak kontrol uygulamalarından alınmış olup uygulama, tanı konulmamış solunum yolu enfeksiyonu bulunan hastalar ve yakınlarını hedef almakta ve hastaneye girişi sırasında öksürük, burun akıntısı, konjesyon, solunum salgılarında artış olan tüm kişileri kapsamaktadır. Solunum Hijyeni /Öksürük Etiketi uygulamasının bileşenleri arasında yer alan hususlar şunlardır:

1. Hastane personeli, hasta ve ziyaretçilerin eğitimi
2.Hasta ve yakınlarına uygun dil ve içerikte işaret ve bilgilendirme broşür/afişlerinin kullanılması
3.Kaynak kontrol önlemleri (öksürme sırasında ağız ve burnun kapatılması, kullanılan mendillerin hemen atılması, gerekli durumlarda maske takılması gibi)
4. Solunum yolu kaynaklı sekresyonlarla temas sonrasında el yıkama
5. Bekleme salonu vb. ortak alanlarda mümkün olduğunca solunum yolu enfeksiyonu geçiren kişilerin diğer kişilerden fiziksel ayrımının (1m'den fazla) sağlanması.

Hastane personelinin, solunum yolu enfeksiyonu belirti ve bulgularını taşıyan kişilerin muayenesi ya da hizmetleri sırasında damlacık enfeksiyonu kontrol önlemlerine ve el hijyeni uygulamalarına azami dikkati göstermeleri önerilmektedir. Solunum yolu enfeksiyonu olan personelde özellikle yüksek riskli hastalarla direkt temastan kaçınması sağlanmalı, ayrıca bu kişilerin hizmet sırasında maske kullanmaları zorunlu tutulmalıdır.

Havayolu önlemleri uygulanması gerekli hastalar tercihen izolasyon odasında tutulmalıdır. Önerilen izolasyon odası, Amerikan standartlarına uygun olarak dizayn edilmiş özel hava dolaşımı ve ventilasyon kapasitesine sahip tek kişilik odalardır. Bu odalar, monitörize edilebilen negatif basınçlı özellikte olmalıdır. Oda havası, yeni yapılan veya onarılan odalar için satte 12 kez, eski odalar için saatte 6 kez değişebilmelidir. Yoğun enfeksiyöz partikül içeren oda havası doğrudan dış ortama tahliye edilmeli veya yeniden odaya sirküle edilecekse mutlaka HEPA filtreden geçirilmelidir. Amerika'da bazı eyaletlerde TB hastalarının kaldığı hastaneler, acil servisler ve bakım evlerinde bu tür bir izolasyon odasının bulunması zorunludur. Buna sahip kuruluşlarda solunum cihaz ve maskelerinin kullanımına yönelik eğitim, testler ve kilit kontrolleri kapsayan özel programlar uygulanmaktadır. Havayolu önlemlerinin çeşitli nedenlerle uygulanamadığı özel muayenehanelerde hastanın cerrahi maske kullanması ve kapısı kapalı ayrı bir muayene odasında tutulması, ayrıca hizmet verecek olan personelin odaya girmeden önce yüksek düzeyli solunum maskesi *(N95, N99, FFP2 veya FFP3)* kullanması gibi alınabilecek kişisel önlemler, hastanın uygun sağlık kuruluşu ya da evine ulaşıncaya kadar havayolu ile bulaşma riskini azaltacaktır.

RİSK GRUPLARI VE TB YAYILMA RİSKİNİ ARTTIRAN ÇEVRESEL FAKTÖRLER

Sağlık kurumlarında *M. tuberculosis*'in yayılımı çok önemli bir risktir. Bu riskin büyüklüğü, ortama, meslek gruplarına, toplumda TB prevalansına, hasta populasyonuna ve hastanelerde uygulanmakta olan TB infeksiyon kontrol ölçümlerine bağlı olarak değişir.

Özellikle pulmoner tüberkülozlu bir hasta ile evde veya yakın temas sağlayan diğer kapalı alanlarda dakikalar veya saatler içerisinde değilde günler ve haftalarca devam eden uzun süreli birliktelikler duyarlı kişiler için yüksek enfeksiyon riskini de beraberinde taşır. Tüberküloz şüpheli bir hasta ile 3 aydan fazla süreli bir arada kalınması enfeksiyona yakalanmada önemli bir risktir. İmmun sistemi baskılanmış kişiler sağlıklı kişilere kıyasla çok daha yüksek oranda TB'a yakalanma ve aktif hastalık tablosu gelişim riskine sahiptirler. Yakın temasın yanısıra aşağıda belirtilen gruplar öncelikli olarak *M.tuberculosis* ile infeksiyona veya maruziyete

yüksek oranda risk taşımaktadırlar. Bunlar;

- Özellikle son 5 yıl içerisinde TB insidensinin yüksek olduğu coğrafik bölge veya ülkelerden göç ederek gelen yabancı kaynaklı yetişkinler ve çocukları ile yüksek riskli bölgelere sıkça seyahat yapanlar,
- Yüksek riskli toplu yaşam alanlarında hastalara hizmet veren görevliler,
- TB-riskli alanlarda örneğin tedavi odaları, göğüs klinikleri, bronkoskopi üniteleri, radyoloji üniteleri, TB laboratuvarları, HIV koğuşları ve otopsi odalarında hizmet veren sağlık çalışanları,
- Tanısı henüz kesinleşmemiş ve gerekli solunum önlemlerini almamış TB'lu hastalara korunmasız yaklaşan sağlık çalışanları,
- Tıbbi açıdan yeterli hizmet alamayan ve düşük gelir düzeyli insan grupları,
- Yerel olarak yüksek tüberküloz insidansı görülen bölgelerde yaşayanlar,
- Yüksek risk kategorilerine giren yetişkinlerle bir arada bulunan bebek, çocuk ve ergenler

M.tuberculosis yayılma riskini arttıran çevresel faktörler arasında;

- Dar ve kapalı alanlarda TB'a maruziyet,
- Yetersiz lokal veya genel havalandırma,
- İnfeksiyöz partikülleri içeren havanın ortamda sirkülasyonu,
- Tıbbi ekipmanların (özellikle pulmoner TB'lu hastalarda kullanılan bronkoskopların) uygun olmayan temizlik ve dezenfeksiyonu ,
- Hasta örneklerinin taşınmasında yanlış uygulamalar yer alır

Sağlık kurumlarında TB yayılma risk değerlendirmesi esas olarak aşağıdaki sınıflandırmaya göre yapılabilmektedir;

- Düşük Risk : Eğer sağlık kurumu her yıl aktif pulmoner TB'lu < 6 hasta kabulüne izin verebiliyorsa veya kurum her yıl için bünyesinde hospitalize ettiği pulmoner TB'lu her hastaya karşılık 100'den fazla profesyonel hasta bakım personeli bulundurabiliyorsa TB yayılma riski düşüktür
- Yüksek Risk : Eğer kurum her yıl için bünyesinde hospitalize ettiği pulmoner TB'lu her hastaya karşılık <10 profesyonel hasta bakım personeli bulundurabiliyorsa TB yayılma riski yüksektir

TB ENFEKSİYONU KONTROL ESASLARI

Sağlık kurumları için *M.tuberculosis'*in yayılımında en kritik risklerden biri, standart solunum yolu önlemleri almadan, TB hastalarının olmadığı odaları ile çoklu ilaç dirençli TB'lu (MDR TB) hastaların bulunduğu ortamlarda dolaşan ve hasta olduğu bilinmeyen TB'lu hastalardır.

Tüm sağlık kurumlarında hızlı tanıyı sağlayabilen, hava kaynaklı önlemler ile şüpheli veya komfirme edilmiş TB hastalarının tedavilerini kapsayan bir TB infeksiyon kontrol programına gereksinim vardır. Böyle bir programın esasını üç aşamalı kontrol oluşturur. Bunlar;

- Yönetimsel kontrol
- Çevresel kontrol
- Solunum önlemleri

Yönetimsel Kontrol

TB kontrollerinin ilk ve en önemli aşaması, personelin TB hastalığına maruziyet riskini azaltacak yönetimsel kuralların titizlikle uygulanmasıdır. Yönetimsel kontrol maksatlı aktivitelerin başlıcaları;

- Kurumda, TB infeksiyon kontrolü için sorumluluk paylaşımı ve görevlendirme yapmak,
- Kurumun TB risk durumunu yönetebilmek,
- Hızlı tanıyı sağlayabilen, hava kaynaklı önlemler ile şüpheli veya komfirme edilmiş TB hastalığı olanların tedavilerini kapsayan yazılı bir TB infeksiyon kontrol planı oluşturmak ve geliştirmek,
- İstenmiş olan laboratuvar çalışmaları ve testlerin zamanında gerçekleşmesi ve sonuçların istemi yapan doktora ve infeksiyon kontrol ekibine ulaşmasını sağlamak,
- Şüpheli veya komfirme edilmiş TB hastalarının yönetimi için etkili çalışma pratiklerini uygulamak,
- Genellikle endoskoplar gibi potansiyel kaynak oluşturabilen kontamine ekipmanların uygun temizlik, dezenfeksiyon ve sterilizasyonlarını sağlamak,
- Hastane çalışanlarına TB ile ilgili olarak, yayılımı, bulguları ve önlemleri konularında düzenli eğitim vermek,
- TB için riskli hastalar ile *M.tuberculosis'*e maruziyet ihtimali olan hastane çalışanları için izlem ve değerlendirmeler yapmak (*Ör: TB izlem programı*),
- Kuruma ait infeksiyon kontrol verileri kullanılarak, epidemiyolojik esaslı uygulamalı korunma prensipleri oluşturmak,
- Lokal veya bölgesel olarak sağlık birimleri ile koordinasyon sağlamak.

TB'lu sağlık çalışanlarna aşağıda belirtilen değerlendirmeler sonrasında işlerine geri dönmeleri için izin verilmelidir. Bunlar;

- 8-24 saat ara ile toplanmış ve en az biri sabah erken alınmış olmak üzere üç balgam örneğinin asido rezistan bakteri (ARB) yönünden smear sonucları negatif olmalı,

- Duyarlılık test sonuçları dikkate alınarak uygulanan tüberküloz tedavisine olumlu yanıt alınmış olmalı,
- Bu konuda uzman bir hekimin denetiminde enfeksiyon açısından işe dönmesinde bir sakınca olmadığına dair bir raporu olmalı,
- Ayrıca göreve döneceği çalışma ortamında riskli hasta olmamasına dikkat edilmelidir. *(Söz konusu kişi HIV'li veya immunsupresif hastaların olduğu yerde görevlendirilmemelidir).*

Sağlık ünitelerinde TB yayılımı ile ilgili kontrol ölçümleri yönetim, mühendislik ve bireysel korunma olarak üç hiyerarşik seviyede gerçekleştirilebilir. Bunlardan yönetimsel ölçümler, en önemli seviye olarak kabul edilir. Geniş kapsamlı olmakla birlikte genellikle hasta bakımı ile ilgilenenlerin uymak zorunda oldukları kurallarıda içeren talimatların hazırlanması ile bu kuralları uygulayabilmede onlara yardımcı olacak personel eğitim ve uygulamalarının sürekli olarak aktarılması ve denetimini kapsar .

TB yayılımı ile ilgili yönetim ölçümleri, ünite başına yılda hizmet verilen pulmoner TB vaka sayısının değerlendirilmesi ile gerçekleştirilir. Bunlar arasında yer alan önemli kritik veriler;

a) Sağlık personeli arasında görülen yıllık pulmoner TB vaka sayısı ve
b) İlgili kuruma bağlı ünitenin düşük, orta ve yüksek risk profilinin saptanmasıdır.

Ünitenin Risk profilinin saptanmasında belirlenen kriterler şunlardır;

1. Düşük Düzey Risk: Yılda < 6 sayıda pulmoner TB olgusu varlığı
2. Orta Düzey Risk: Yılda ≥ 6 sayıda pulmoner TB olgusu varlığı ve sağlık personelinde TB infeksiyonu riskinin (tüberkülin deri testinde pozitifleşme) yılda ortalama < % 2 olması.
3.Yüksek Düzey Risk: Yılda ≥ 6 sayıda pulmoner TB olgusu varlığı ve sağlık personelinde yıllık ortalama TB infeksiyonu riskinin > % 2'den yüksek olması

Çevresel kontrol

İkinci aşama kontrol önlemleri olarak çevresel kontrolün amacı ortam havasında bulunan enfeksiyöz partiküllerin yoğunluğunu azaltmak ve yayılımını önlemektir.

Primer çevresel kontroller, infeksiyon kaynağını biyogüvenlik kabini gibi lokal kullanıma ait havalandırma cihazları kullanarak ve genel havalandırma ile kirli havanın seyreltilip temizlenmesini sağlayarak yapılır.

Sekonder çevresel kontroller ise hava kaynaklı infeksiyonlara karşı izolasyon odalarına bitişik alanlarda, havanın kontaminasyonunu engelleyip kontrollü hava akımı ile, HEPA filtrasyon ve UVGI ile gerçekleştirilir.

Solunum önlemleri

İlk iki kontrol aşaması *M. tuberculosis'*e maruz kalabilecek alanların sayısını azaltmayı ve buna bağlı olarak bu patojene maruz kalacak personel sayısını da asgari düzeye düşürmeyi sağlar. Bu iki kontrol uygulaması sınırlı alanlarda maruziyet riskini azaltmasına rağmen elimine etmez bu alanlar hala *M. tuberculosis'*e maruz kalabilir. Buralara giriş yapacak personeller bu patojene maruz kalabilme riskine karşılık üçüncü kontrol aşaması olarak, yüksek riskli alanlar için özel koruyucu solunum ekipmanı kullanmalıdırlar. Bu ekipman ile TB'lu bir hastanın ortam havasına saldığı infeksiyöz damlacıkların sağlık çalışanlarına bulaşma riski azaltılır. Riski azaltmak için aşağıdaki önlemler alınabilir;

1. Hava kaynaklı enfeksiyöz ajanlar için korunma programının kurumda uygulanmasına özen gösterilmesi,
2. Solunum yolu ile bulaşı önleme konusunda sağlık çalışanlarının eğitimi,
3. Hastaların solunum hijyeni ve emniyetli öksürük konusunda eğitimi.

TB ENFEKSİYON KONTROL PROGRAMI

Her sağlık kuruluşunun genel enfeksiyon kontrol programının bir parçası olarak TB enfeksiyon kontrol programı olmalıdır. TB enfeksiyon kontrol programının bazı özel ayrıntıları, tanısı kesin olarak konmuş veya şüpheli TB olguları ile karşılaşılıp karşılaşılmayacağını veya bu gibi olguların bir başka sağlık kuruluşuna nakledilip nakledilmeyeceğine göre değişir. Bu kararı verecek yöneticilerin yerel ve genel sağlık birimlerinden tıbbi ve epidemiyolojik görüş alması gerekir.

○ **Şüpheli veya kesin tanı konmuş olguları kabul edecek sağlık kurumlarında oluşturulacak TB enfeksiyon kontrol programı .**

Bu program, yönetim kontrolleri, çevre kontrolleri ve solunumla ilgili koruyucu kontrol aşamalarını kapsar.

Böyle bir TB Enfeksiyon Kontrol Programı oluşturabilmek için aşağıdaki basamaklar uygulanmalıdır:

1. Tüberküloz, enfeksiyon kontrolü, meslek sağlığı, çevresel önlemler ve solunum önlemleri gibi konularda tecrübeli kişi veya grubların denetim yetkisi olmalıdır.

Bu kişi yada grublara, TB risk değerlendirmelerinde, TB enfeksiyon kontrol prensiplerini uygulamada ve sağlık çalışanlarını eğitmede gerekli destek verilmelidir. Bunun için;

- TB enfeksiyon kontrol programını uygulamadan sorumlu kişiler eğitilmelidir
- Yetki eğer bir gruba verildiyse gruptan bir kişi, sorunların yönlendirilmesinde sorumlu kişi olarak belirlenmelidir.

2. Yazılı bir TB enfeksiyon kontrol planı hazırlayıp bu plan her yıl güncellenmelidir. Şüpheli veya tanısı konulmuş TB olgularına zorunlu tutulacak gerekli koruyucu solunum önlemleri bu planda anlaşılabilir ifadelerle yer almalıdır.
3. Şüpheli veya yanlış tanı konulmuş bir TB olgusuna, gerekli koruyucu solunum önlemleri aldırılmamışsa yada yönetimsel, çevresel veya solunum önlemleri başarısız olmuş ise soruna yönelik değerlendirmeler yapılmalıdır
4. Sağlık kuruluşunda *M. tuberculosis* şüpheli bir yayılımdan söz ediliyorsa il veya bölge sağlık müdürlükleri ile temasa geçilerek bir arada araştırma yapılmalıdır.
5. İl veya bölge sağlık müdürlükleri ile işbirliği yaparak, risk değerlendirmesi, yazılı bir TB enfeksiyon kontrol planı hazırlanması, şüpheli veya tanısı konulmuş bir olguların tedavisi, sağlık çalışanlarının eğitimi, sağlık çalışanlarının bilgi ve becerilerinin değerlendirilmesi, sorun değerlendirmesi ve işbirliği çalışmalarını içeren bir yönetim kontrol programı geliştirilmelidir.
6. Çevresel kontroller uygulamaya konulmalıdır *(İzolasyon odaları dahil)*
7. Solunum önleme programı uygulamaya konmalıdır.
8. Sağlık çalışanlarına sürekli hizmet içi eğitim verilmelidir.
9. Başka kurumlardan nakil gelen şüpheli veya tanısı konulmuş olguların kabulu için bir plan geliştirilmelidir.

- **Şüpheli veya kesin tanı konmuş olguları kabul etmeyen sağlık kurumlarında oluşturulacak TB enfeksiyon kontrol programı**

Hastaların nakil öncesi bir süre kalabileceği sağlık kurumlarının da yönetimsel, çevresel kontroller ile solunum önlemlerini içeren bir TB enfeksiyon kontrol programı uygulamaları gereklidir. Bu amaçla aşağıdaki basamaklar uygulanmalıdır:

1. TB enfeksiyon kontrol programı için uygun bir personel görevlendirilmelidir,
2. Şüpheli veya kesin tanı konmuş olguları tanımlayan ve bir başka sağlık kuruluşuna nakillerde o kuruluştaki sorumluların dikkate alınması gerekli konuları içeren yazılı bir TB enfeksiyon kontrol planı hazırlanmalıdır. Plan, hastaların

nakil zamanına kadar diğer kişilerden izolasyonunu sağlayacak gerekli önlemleri de içermelidir (*Örneğin, bu amaçla pulmoner tüberkülozlu hastanın nakli sırasında bir cerrahi maske takması sağlanmalı*). Bu plan her yıl gözden geçirilmelidir.
3. Hastaların izolasyonu ve transferi sağlanamıyorsa bu sorunun çözümüne yönelikdeğerlendirme yapılmalıdır.
4. Sağlık kuruluşunda *M. tuberculosis* şüpheli bir yayılımdan söz ediliyorsa il veya bölge sağlık müdürlükleri ile temasa geçilerek bir arada araştırma yapılmalıdır.
5. İl veya bölge sağlık müdürlükleri ile işbirliği yaparak, risk değerlendirmesi yapılmalı, ve yazılı bir TB enfeksiyon kontrol planı hazırlanmalıdır.

TÜBERKÜLOZUN YAYILIMININ ÖNLENMESİNDE ÇEVRESEL KONTROLLER

TB ve MDR-TB salgınları 1980'lerde ve 1990'lı yılların başlarında hastaneler, bakım evleri, cezaevleri, klinikler ve kimsesizlere ait barınaklarda ciddi bir sağlık sorunu olarak gözlenmiştir. Özellikle immünosüpresif kişiler arasındaki ölümlerin önemli bir bölümü MDR-TB ile ilişkilendirilmiş ve bu kişiler arasında bulaşmanın hava yolu ile gerçekleştiği epidemiyolojik çalışmalarla ortaya konmuştur. Kapalı yaşam koşullarına sahip ortamlarda bireysel kontrol önlemleri yerine genellikle çevresel kontrol yöntemlerinden yararlanılması tercih edilir. *M.tuberculosis*'i etkisiz hale getirmek, ortamdan temizlemek ve korunmak amacıyla çevresel kontrol önlemleri olarak ***havalandırma sistemleri*** (*lokal ve genel*), ***HEPA filtrasyon*** ile ***Ultraviyole germisidal irradyasyon*** teknolojileri ve ***filtreli kişisel solunum maskeleri*** kullanılmaktadır.

Çevresel mühendislik kontrol önlemleri kurumsal TB kontrol programının önemli bir parçasını oluştursada, hiç kuşkusuz en önemli kontrol önlemlerinin başında TB şüpheli kişilerin en kısa sürede tanısına yönelik klinik ve laboratuvar çalışmalarının gerçekleştirilmesi ve bu periyod içerisinde gerekli karantina işlemlerinin uygulanabilmesi ve kesin tanı ile birlikte tedavisinin takibidir.

Bu kontroller hava yolu ile enfeksiyöz partiküllerin yayılmasını önlemede ve konsantrasyonunu azaltmada yardımcıdır. Çevresel kontroller TB enfeksiyon kontrol programının ikinci aşamasını oluşturur ve yönetimsel kontrol basamağı ile uyum içerisinde yürütülür. Çevresel kontrollerin etkin kullanımı, kaynağında *(TB'lu hastanın öksürmesi sırasında veya enfekte laboratuvar numunesi ile)* veya çalışma ortamının genelinde mesleki olarak *M.tuberculosis'e* maruziyeti azaltabilir. Kaynağın tanımlanması ve kontaminantın çoğaldığı yerde sınırlandırılması için kaynak konrolü yapılır. Kaynak kontrol tekniklerinin kullanımı ile havada serbest dolaşan enfeksiyöz partiküllerin yayılımı önlenebilir veya azaltılabilir. Bu teknikler, özellikle enfeksiyöz aerosollerin oluşumuna yol açan uygulamalarda

(*Ör:Bronkoskopi, balgam indüksiyonu, endotrakeal entübasyon, aspirasyon, TB abse irrigasyonu, aerosol uygulamaları, tedavi olmamış TB'lu kadavralar üzerinde yapılan otopsi uygulamaları ve bazı laboratuvar örneklerine yapılan uygulamalar*) ve aktif TB'lu hastaların öksürmeleri ve aksırmaları sırasında kritiktir. Sağlık kurumlarında veya kapalı bir alanda hava akış yönünü kontrol, havadaki kontamine partikülleri temizleme ve havayı dilüe etmek için genel havalandırma uygulanabilir. Hava temizleme teknolojileri arasında HEPA filtrasyon sistemi, ortamdaki *M.tuberculosis* partiküllerini azaltmada ve UVIG ise enfeksiyon riski oluşturabilen mikroorganizmaları inaktive edebilmek veya öldürebilmek amacıyla kullanılmaktadır.

A) HAVALANDIRMA

Hastanede çalışan ve sağlık hizmeti alan insanların ihtiyacı olan temiz hava ve nem uygun yerleştirilmiş klima sistemleri ile mümkündür. Sağlık kuruluşlarında havalandırma sistemleri, ilgili sağlık personeli, enfeksiyon kontrol uygulama sorumluları ve ilgili mühendislerin işbirliği ile dizayn edilmeli ve gerektiğinde modifiye edilmelidir. Hastane binaları havalandırılırken mevcut havalandırma sistemi; ortam havasının çalışanlar, hastalar ve ziyaretçiler için optimum sıcaklık ve neme sahip olmasını sağlamalı, kokuyu kontrol edilebilmeli, kontamine havayı uzaklaştırabilmeli, duyarlı hasta ve çalışanların hava yolu ile bulaşabilen enfeksiyonlara karşı korunmasını sağlayabilmeli ve enfekte kişilerden patojenlerin hava yolu ile çevreye yayılımını en aza indirebilmelidir. Havalandırma sistemi; dışarıdaki havayı içeri alan, filtre eden, nem kontrolü, ısıtma ve soğutma ekipmanları ile fanlar, fan kanalları ve hava tahliye sistemlerinden oluşur. Filtre yetersizlikleri, yanlış montaj ve yetersiz bakım nedenleri ile havalandırma sistemlerinin performanslarındaki azalma, hava kaynaklı infeksiyonların yayılımına katkıda bulunur.

Klinikler, hastaneler ve acil yardım merkezleri gibi yüksek risk taşıyan ortamlarda şüpheli vakalar için ayrı bir havalandırma sistemine sahip izolasyon odaları oldukça önem taşımaktadır. İnfeksiyöz partiküllerin yoğun olduğu TB hastalarına ait izolasyon veya tedavi odalarındaki havanın %100'ünün dışarıya atılmasını sağlayan negatif basınçlı özel bir havalandırmalı sistem olmalıdır. Böyle bir sistemde, havalandırma hastaya doğru olmalı ve kirli hava kullanılmadan dışarı atılmalıdır. Bunun yanısıra risk grubu, immünsüpresif hastaları TB'dan korumak için pozitif basınçlı odalardan da yararlanılabilir. Pozitif basınçlı odalarda giren hava çıkan

havadan fazla olduğu biçin böyle odalarda yatan hastalar solunum yolu ile bulaşabilen infeksiyöz ajanlara karşı önemli ölçüde korunmuş olurlar. Bunun için hasta odası ile oda dışındaki alan arasında >2.5 Pa'lık basınç farkı oluşturulmalı ve saatte 3-10 hava değişimi sağlanabilmelidir. Hastalık önleme ve kontrol merkezi (CDC), koridorlar ve izolasyon odaları arasında basınç gradyanları bulunan binalardaki havalandırmanın, odadan odaya bulaşmayı önlemek için havanın izolasyon odalarına doğru akacak şekilde *(temiz alandan kontamine alana doğru)* tasarımlarının yapılmasını tavsiye etmektedir. Havalandırma, yoğunlaşmanın azaltılması ya da infeksiyöz partiküllerin havadan temizlenmesi ile havanın düşük riskli komşu alanlardan izolasyon ve işlem odalarına doğru akmasını sağlayacak şekilde tasarlanmalıdır. Hava kaynaklı partikülleri minimize etmek için havanın en az 0.25m/saniye hızla HEPA filtreden geçerek odada sirküle olması gerekmektedir.

Bulaşma olasılığı, havada bulunan enfeksiyöz partiküllerin yoğunluğu ve solunan hava miktarı ile ilişkilidir. Aeresollü pentamidin tedavilerinin yapıldığı odalarda bulunmak da ayrıca riski arttırmaktadır. CDC, nozokomiyal TB vakaları ile ilgili olarak yayınladığı önerilerde " öksürüğü tetikleyen tüm uygulamaların negatif basınçlı oda ya da kabinlerde yapılması" gerektiğini önermiş ve "bu oda ya da kabinlerdeki havanın doğrudan bina dışına ve giriş ventillerinden uzağa verilmesi"gerekliliğini belirtmiştir.

Çevresel kontroller ile ilgili dökümanlar, hastane çalışanlarının eğitiminde ve TB enfeksiyon kontrol programları kapsamında, bu bilgilerin nasıl kullanılabileceği konusunda yardımcı olur. Bu bilgiler, havalandırma sisteminin dizaynı, seçimi, donanımı ve bakımı ile ilgili tavsiyede bulunabilen uzmanlarla konsultasyon yerine kullanılmamalıdır. Havalandırma sistemlerinin çalıştırılması ve bakımı uygun değilse çevresel kontroller için başarılı bir TB infeksiyon programının ana unsurlarını oluşturan personel eğitim ve öğretimi yetersiz kalacaktır.

a)Bölgesel Havalandırma

Bölgesel havalandırmalar havada bulunan kirleticileri kaynaklarında ya da kaynaklarının yanında yakalamayı amaçlar. Böylece infeksiyöz ajanların ortamdaki kişilerle karşılaşması engellenerek ortadan uzaklaştırılması sağlanır. İnfeksiyöz ajanları ortama dağılmadan önce etkisiz hale getirdiği için bu yöntem havada bulunan kontaminantların yakalanmasında en uygun yöntem olarak kabul edilir. Bölgesel havalandırma iki şekilde uygulanabilir.

1) Kapalı ortamlar: Enfeksiyon kaynağının dış ortamla irtibatını kısmen ya da tamamen keser.

2) Harici aygıtlar: İnfeksiyon kaynağı, aygıtın yakınında ancak dışındadır.

Kapalı ortamlar, havadaki kontaminantların sağlık çalışanlarına bulaşmasını tam anlamıyla önleyebilmeleri nedeniyle her zaman harici cihazlara tercih edilmektedir.

Kapalı ortamlar; Bölgesel havalandırma maksatlı kullanılan kapalı ortamlar arasında;
1. Balgamın alınmasında ve aerosol ilaçların uygulanmasında kullanılan kabinler,
2. Bir hastanın dış ortamla irtibatının kesilmesi ve izole edilmesi için çadır ve kapşonlar,
3. Biyoemniyet kabinleri yer alır.

Bu aygıtlar piyasadan farklı formlarda temin edilir. İçlerinde en basiti, hastanın üzerine yerleştirilen ve dış havalandırma sistemiyle bağlantısı olan bir çadırdır. En kompleks olanı ise kendi içinde bir hava akımı ve döngü sistemi içeren kabinlerdir. Bir hastanın taburcu olmasını takiben yeni hastanın gelişi arasındaki zaman dilimi içerisinde çadır ve kabin havasındaki partiküllerin en az % 99'u ortamdan uzaklaştırılabilmelidir. Kapalı bir ortamda havada bulunan partiküllerin % 99 yada % 99,9'unun temizlenmesi için gereken zaman;
a) oda veya kabinin hava/m3 deki miktarı ile giriş kaynağından çıkan havanın hızına,
b) havalandırmanın giriş ve çıkış yerlerine,
c) odanın veya kabinin yapısına bağlıdır.

Kapşon ve kabinlerin yüzeyleri düzenli aralıklarla üretici firmaların tavsiyelerine göre temizlenmelidir. Bahsedilen kapalı ortamların havası, aygıtın yerleştirildiği oda içine veya dışına tahliye edilir. Eğer çıkan hava bir oda içine tahliye ediliyorsa uç noktaya bir hepa filtre takılmalıdır. Hepa filtrenin tahliye kısmına bir fan takılarak çevreye göre negatif basınçlı bir ortam yaratılmalıdır. Böylece odadaki kontamine olmamış hava, tüm açıklıklardan kabin içerisine girebilecek ancak enfeksiyöz damlacıkların kabin dışına çıkışı engellenecektir. Ticari olarak satılan aygıtların tamamı hepafiltreli olup ayrıca takılmalarına gerek yoktur. Bir cihaza hepafiltre takılamıyorsa çıkan hava doğrudan dışarıya verilmelidir.

Harici aygıtlar: Bölgesel havalandırma için kullanılan harici aygıtlar, aktif enfeksiyonlu hastanın içerisinde bulunmadığı ancak hastanın yakınında yer alan aygıtlardır.

Bu aygıtlarda üretilen hava akımı, hasta yüzüne yakın çapraz akımları damlacık kaçışına izin vermeyecek şekilde önleyebilmektedir. Mümkün olduğunca hastanın yüzü aygıtın hava giriş bölümüne dönük tutularak her öksürük veya aksırığın aygıt içerisine doğru gerçekleşmesi amaçlanır. Söz konusu aygıt, hasta solunum alanında dakikada 200 feet (*yaklaşık 64 m*) hava akım hızı sağlayarak, hastaya ait damlacıkların etrafa saçılmasını engelleyebilmelidir. Bu aygıtlarda solunum hızının kontrolü önemlidir.

b) Genel Havalandırma

Genel havalandırma ile hem havanın dilüsyonu hem de ortam havasındaki kontamine edici maddelerin uzaklaştırılması ile hava kalitesi arttırılır. Bu yöntemin sağladığı kontamine olmamış hava ile kontamine oda havası karıştırılır ve bu karışım havası son basamakta tahliye sistemi ile odadan uzaklaştırılır. Bu işlemler ile oda havasındaki kontamine damlacık yoğunluğu azaltılması hedeflenir. Bu amaçla iki farklı sistem kullanılır: Bunlar, tek geçişli hava sistemi ile geri dönüşümlü sistemlerdir.

- Tek geçişli hava sisteminde hava, ya ısıtılmış veya soğutulmuş dış ortam havasıdır, ya da çok sayıda bölgeye hava sağlayan merkezi bir sisteme ait kontamine olmamış havadır. Bu hava bir bölge veya odadan geçtikten sonra tamamı dışarıya atılır. Tek geçişli sistem izolasyon odaları için tercih edilir. Çünkü bu sistemde kontamine havanın sağlık kurumunun başka bölgelerine ulaşması engellenir.
- Geri dönüşümlü sistemde ise çıkan kontamine havanın bir kısmı doğrudan dışarı verilip temiz hava ile yer değiştirilir. Bu hava, tahliye edilmeyen kontamine hava ile karışır. Karışım bir işleme tabi tutulmazsa kontamine havanın önemli ölçüde kontamine olmayan diğer bölümlere yayılmasına yol açabilir. Hava karışımının genel havalandırmaya tekrar verilmesi yerine özel bir oda veya bölgeye yönlendirilmesi ile başka alanların kontamine olması önlenebilir.

Tüm havalandırma sistemlerinin bakım ve idamesi infeksiyon kontrolü açısından oldukça önemlidir. İdeal koşullarda kurulmuş olsada düzenli monitörizasyonu ve bakımı yapılmayan her havalandırma sisteminde aksaklığın oluşması kaçınılmazdır. Zamanında farkedilmeyen sorunların hastalara ve çalışan sağlık personeline bedeli ağır olur. Peryodik bakımları yapılamayan veya geciktirilen havalandırma sistemleri aynı zamanda hava kaynaklı infeksiyöz partiküller için ciddi bir rezervuar niteliği taşıyabileceği her zaman düşünülmelidir.

B) HEPA FİLTRASYON

Havalandırma sistemleri ve HEPA filtrelerinin kullanımı, havada bulunan bulaşıcı partiküllerin yoğunlaşmasının azaltılmasında kullanılan önemli mühendislik kontrolleridir. Bu yöntemler büyük çoğunlukla UVGI teknikleri ile birlikte kullanılmaktadır. HEPA filtreler, çapı 0.3 µm üzerinde olan tüm partiküllerin %99.97'sinin tutarak havanın temizlenmesini sağlayabilecek niteliktedir. HEPA filtrasyon sisteminin kurulumu ve montajı sırasında çok büyük titizlik ve dikkat gerekmektedir. HEPA filtrasyon ve UVGI sistemlerinin birlikte kullanılması yüksek riskli ortamlarda hava sterilizasyonunun sağlanmasında önerilen en iyi yöntemlerden biri olarak gösterilmektedir.

Hepa filtreleri izolasyon odalarında ve kabinlerde hava dış ortama verilmeden önce, havanın temizlenmesine yardımcı bir güvenlik önlemi olarak kullanılır. Genel havalandırmanın olmadığı veya oda havasının geri dönüşümünün tercih edilmesi durumlarında Hepa filtreden geçirilen havanın geri dönüşümü 3 şekilde sağlanır:

1. Oda havası, içerisine Hepa filtre yerleştirilmiş bir borudan geçirilerek tekrar odaya verilebilir
2. Hava, oda tavanına ya da duvarına yerleştirilmiş Hepa filtreden geçirilerek ortama dönüşümü sağlanır
3. Hava, odaya yerleştirilmiş taşınabilir nitelikteki Hepa sisteminden geçirilebilir.

Bu yöntemlerden ilk ikisi kolayca yerlerinden kaldırılamayan geri dönüşüm sistemleri olduğundan bunlar için "sabit oda havası geri dönüşüm sistemleri" olarak ifade edilir. Sabit sistemler taşınabilir sistemlere göre daha güvenilirdir. Ayrıca bazı sabit sistemlerle sağlanan hava akımı kapasitesi taşınabilir sistemlerin çok üzerindedir."Taşınabilir oda havası geri dönüşüm sistemleri" kullanıldığında, Hepa filtresinden en yüksek akışı sağlayacak yüksek hacimli hava akımları tercih edilir. Sistemin yerleştirilmesi sırasında izolasyon odasındaki havanın Hepa filtreden en uygun şekilde geçmesi amaçlanır. Sistemin en yüksek verimle çalışabilmesi için hava akımını bozacak engellere *(odanın dekorasyonu için kullanılan eşyalar, tıbbi malzemeler, duvarlar)* ve sistemin özelliklerine *(fiziksel boyut, hava akımı kapasitesi, havanın giriş ve çıkış yerleri, gürültü)* dikkat edilmelidir.

Hepa filtrelerin bakımı: Hepa filtrelerin etkinliği, doğru yerleştirilmelerine, kontrol edilmelerine ve bakımlarının özenle yapılmasına bağlıdır. Hepa filtreler yerleştirilirken segmentleri arasına, ayrıca filtrenin yatağı ile çerçevesi arasına

sızıntının olmamasına dikkat edilmeli, bunun için düzenli aralıklarla kontroller yapılmalıdır. Kantitatif filtre performans testi ilk yerleştirmede ve sonraki her filtre değişiminde uygulanmalıdır. Her 6-12 ayda bir sızıntı testi yapılmalıdır. Filtre değişim zamanının doğru ve güvenilir bir şekilde saptanması için filtre sisteminin içine bir manometre ya da basınca duyarlı bir cihaz konulmalıdır. Yapılan laboratuar çalışmalarında, canlı mikobakterilerin Hepa filtre ve N95 disposable solunum filtrelerinden geçtikten sonra tekrar aerolize olmalarının normal koşullarda mümkün olmadığı gösterilmiştir. Oysa havalandırma sistemlerinde kullanılmış, kullanım ömrü dolmuş Hepa filtrelerle uğraşanlar için mevcut riskler henüz değerlendirilmemiştir. Bu nedenle bu filtrelerle uğraşanların göz koruyucu, eldiven ve solunum ekipmanı kullanması gerekir. Hepa filtreleri çıkarmadan önce % 10 çamaşır suyu ya da diğer mikobakterisitlerle dezenfekte edilmelidir. Filtrenin parçaları üzerine "TBC ile kontamine hava" veya benzer ikazlar içeren yazı yapıştırılmalıdır. Düşük etkinliğe sahip bir veya daha fazla tek kullanımlık ön filtreler Hepa filtrelerin ömrünü en az % 25 uzatır.

C) ULTRAVİYOLE UYGULAMASI

UVGI, 100-280 nm arasında değişebilen kısa dalga boyuna sahip bir elektromanyetik radyasyon formudur. Son onbeş yıldır, kurumlarda TB yayılımını kontrol edebilmede UVGI kullanımı ciddi olarak önerilmektedir. Bu amaçla direkt ve üst hava ışımalı UV ekipmanları kullanılır. UV lambalarının en etkili dalga boyu 253.7 nm olan TUV-C tipleri olup etkili olduğu süre 2500-3000 saat kadardır. Uzun süredir ultraviyole ışınlarının hava kaynaklı infeksiyöz partikülleri tahrip ettiği bilinmektedir. Deneysel olarak gerçekleştirilen diğer bir çok çalışmada da mikobakterilerin ültraviyole ışınlarına karşı duyarlılığı gösterilmiş ve mikobakteriyel türler arasında gözlenen değişkenliğe işaret edilmiştir. Bu amaçla CDC tarafından, hava yoluyla enfeksiyonun yayılımını önlenmede UVGI kullanımına yönelik oldukça kapsamlı bir yazı hazırlanmıştır.

Kurum ve laboratuvarlardaki havanın yeniden sirkülasyonu öncesi infeksiyöz partikülleri dezenfekte edebilmek için sabit veya taşınabilir özellikteki sistemlerin hava kanallarında UVGI kullanılır. Oda veya koridorlarda üst hava ışımalı olarak ortam havasının dezenfeksiyonu amacıyla genellikle yerden yaklaşık 7 feet yükseklikte (227.36 cm) duvara veya tavana monte edilmiş halde reflektörlü ültraviyole donanımlarının kullanımı önerilmektedir. UV lambalarının penatrasyon özelliği olmadığından biyogüvenlik açısından ortamda diğer dezenfeksiyon

uygulamaları ihmal edilmemelidir. Hem hava hemde yüzey dezenfeksiyonunda etkili olmasına rağmen direkt ışımalı UV lamba altında koruyucu özellikteki giysi,başlık ve gözlük olmaksızın çalışmak veya altında bulunmak zararlı ve tehlikelidir. Buna karşılık havanın dezenfeksiyonunu sağlayan üst hava ışımalı reflektörlü UV lamba altında çalışmak zararlı değildir. Amerikan Toraks Derneği tarafından yapılan açıklamada reflektörlü donanımların, uygun şekilde kurulup, monte edildiğinde, keratokonjoktivit ve deri eritemi gibi ışın yan etkilerini de asgari düzeye indirgeyerek havadaki infeksiyöz partiküllerin öldürülmesinde oldukça etkili olabileceği ifade edilmektedir. Üst hava ışımalı ortam havasının dezenfeksiyonu için bir odaya yerleştirilecek UV lamba sayısı odanın boyutlarına göre değişir. Bu amaçla 3-4 m uzunluk ve 3-4 m genişliğindeki bir odaya %90 hava dezenfeksiyonu için 1 adet, %99 hava dezenfeksiyonu için 2 adet 15 Watt(W)'lık veya 1 adet 30 W'lık UV lamba kullanılmalıdır. Aynı şekilde 3-4 m uzunluk 5.5 -7 m genişlikteki alanlarda %90 hava dezenfeksiyonu için 3 adet 15 W veya 1 adet 30 W yada 1 adet 40 W'lık UV lambası kullanılırken %99 hava dezenfeksiyonu için 6 adet 15 W veya 2 adet 30 W yada 2 adet 40 W'lık UV lambası kullanımı önerilmektedir. Lambalar 2-4 haftada bir alkollü bez ile silinmelidir.

UV lambalarının biyogüvenlik ekipmanı olarak etkinliği tartışılmakla birlikte CDC hala bu lambaların kullanımını önermektedir. İnfeksiyonların önlenmesinde UVGI uygulaması, çok sık kullanılmayan bir yöntem olmakla birlikte yetkililerce hastane ve diğer kuruluşlara ait yüksek riskli ortamlarda UVGI'nin MDR-TB yayılımının kontrol altında tutulmasında en iyi çevresel önlemlerden biri olduğunu bildirmektedirler. William Firth Wells "rahatlık için havalandırma, fakat enfeksiyon kontrolü için ışın uygulama" olarak görüşünü belirterek bu düşünceye katıldığını ifade etmiştir.

UVGI, izolasyon odalarından genel sirkülasyona havanın tahliyesi öncesinde gerçekleştirilmesi gerekli olan HEPA filtrasyon işleminin yerine kullanılmaz. Yüzey dezenfeksiyonu gerektirmeyen alanlarda, örneğin TB'lu hasta odalarında, muayene odaları veya hasta bekleme salonları gibi genel kullanım alanlarında mekanik hava sirkülasyonu sağlayan kapalı UV lamba içeren özel tasarlanmış cihazlar kullanılabilir.

D) FİLTRELİ SOLUNUM MASKESİ KULLANIMI

Aerosol pentamidin tedavileri, diagnostik balgam indüksiyonları, bronkoskopi

ve otopsi gibi uygulamalar TB basilinin bulaşması ile ilişkilendirilmiş olup, Meslek Sağlığı ve Güvenliği İdaresi (OSHA) tarafından bu alanlarda görevli personelin HEPA filtreli kişisel solunum maskesi dahil olmak üzere önlük, eldiven, gözlük ve kapalı tipte değiştirilebilir izolasyon odası ayakkabıları gibi diğer özel koruyucu giysilerle gerekli önlemleri alarak işlem yapması ve bunun uygulama protokollerine konmasının zorunlu tutulması gerektiği önerilmektedir. Bu maskelerin gerektiği şekilde kullanılabilmesi için uyumluluk ve eğitim gereklidir.
HEPA filtreli standart maskeler *(N95, FFP2 veya FFP3 gibi)* çapı 0.3 µ üzerinde olan tüm partiküllerin %99.97'sinin filtreleyecek şekilde tasarlanmıştır. Kişisel solunum maskeleri, sızıntıyı önleyecek şekilde tasarlanmış olmakla birlikte, pahalı ve kullanımı nisbeten sıkıntılıdır. Bunlar ayrıca solunumu zorladığından pulmoner tüberküloz hastaların bu cihazları tolere edebilmelerinde sıkıntılar gözlenebilmektedir. Hastanın tolere edilebilmesi halinde özellikle smear pozitif hastaların nakilleri sırasında bunların kullanılması düşünülmelidir. Basit ameliyat maskelerinin TB'un yayılımını önlemede etkili olduğunu gösteren herhangi bir veri yoktur. Kişisel solunum cihazlarının kullanımında maliyetler de önemlidir. Standart bir cerrahi maskesi 0.06 USD'a mal olurken, HEPA filtreli maskenin birim fiyatı 7,50 ile 9,08 USD arasında değişmektedir.

ÖZEL HAVALANDIRMA GEREKLİ ALANLARDA DİKKAT EDİLECEK HUSUSLAR:
Medikal ortamlarda TB bulaşma riski, özellikle havadaki enfekte partiküllerin konsantrasyonuna bağlıdır. Ortama enfekte partiküller yayan smear pozitif hastalar çevre için yüksek risk taşıdıklarından ciddi tehlike oluştururlar. Acil yardım üniteleri, TB koğuşları ya da klinikleri, aeresol tedavi odaları ve bronkoskopi suitleri gibi hava kaynaklı enfekte partiküllerin yayıldığı ve şüpheli hastaların kaldığı alanlara kontrollü hava uygulaması gereklidir. Bu alanlarda korunma, özel havalandırma, HEPA filtrasyon, UVGI ve HEPA filtreli solunum maskeleri ile sağlanmaktadır.

Genel olarak hastanelerde özel havalandırma gerektiren alanlar;
- Ameliyat salonları
- Yüksek riskli, İmmün kompromize hastaların kaldıkları korumalı odalar
- Hava yolu ile bulaşabilen enfeksiyonlu hastaların (*Ör: M.tuberculosis, VZV, veya Rubeola virus'un neden olduğu*) kaldığı izolasyon odalarıdır. Ayaktan hastalara ilk yardım uygulamalarının yapıldığı acil servislerinde mevcut odalardan

en az biri hava kaynaklı bulaşıcı bir enfeksiyonu olmasından şüphelenilen hastalar için uygun donanımlı izolasyon odası olarak ayrılmalıdır.

İzolasyon odalarının olduğu alanlarda dikkat edilecek hususlar;

- Negatif basınçlı odalarda, hava akımı kapalı devre sistemi ile monitörize edilmeli,
- İdeal olarak saatteki hava sirkülasyonu(ACH) mevcut sistemler için en az 6 ACH , yeni veya tadilat gören yerlerde 12 ACH olmalı
- Mümkünse hava, tedavi odaları ve negatif basınçlı odalardan direkt olarak dışarıya verilmelidir. TB hastalarına cerrahi işlem yapılacaksa bu işlem tercihan hastanın TB tedavisi sonrasına bırakılmalıdır. Bu hastalara genel anestezi sırasında uygulanacak entübasyon, öksürük refleksini arttırabildiğinden enfeksiyon kontrol çabalarını azaltır ve potansiyel olarak solunum ekipmanlarını kontamine edebilir. TB izolasyonu için ameliyat salonlarında gerekli hava sirkülasyonu 15 ACH olmalıdır. Koridorla ilişkili pozitif hava akımının varlığı TB'un ameliyathane personeline yayılma riskini doğurabilir. Eğer mümkünse, cerrahi işlem uygulanacak TB'lu hastanın entübasyon ve ekstübasyonu izolasyon odasında yapılmalıdır.

Şüpheli veya tanısı konmuş TB'lu hastanın acil cerrahi işlem endikasyonu varsa spesifik enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması zorunludur. Bu amaçla önerilen izlenmesi gerekli stratejiler şunlardır;

- Ameliyat salonunda en üst seviyede yeterli bir hava sikülasyonu sağlamak için TB'lu hasta, en son ameliyat vakası olarak planlanmalıdır
- Ameliyat ekibi, ameliyat sırasında tahliye valf'i olmayan N95 solunum maskesi kullanmalıdır.
- Hasta entübasyonuna bağlı öksürme sonrası veya hasta ekstübe edilip aspire edildikten sonra ortamda oluşan hava kaynaklı enfeksiyöz partiküllerin %99'unu temizleyecek yeterli ACH oluşana kadar uygun bir süre ameliyat salonu kapısı kapalı tutulmalıdır.
- Hasta, ameliyat salonunda extübe edilmeli veya ameliyat salonu dışındaki ayılma odasından ziyade izolasyon odasında ayıltılmalıdır.

TÜBERKÜLOZ LABORATUVARINDA MİKOBAKTERİYEL İNFEKSİYONLARA KARŞI KORUNMA VE KONTROL

Dikkatsizlik, laboratuvar ekipmanlarının uygun bakımlarının bilinmemesi, enfekte materyalle çalışırken riskli ve yanlış tekniklerin kullanımı sonucu enfeksiyonlar gözlenebilmektedir.

Çoğunluğu iğne batması veya ağızla pipet kullanımına bağlı olarak gelişmekle birlikte materyalin dökülmesi veya çevreye sıçraması ve kültür tüp veya plaklarının düşürülerek kırılması gibi laboratuvar kazaları ile enfekte aerosollere maruz kalma laboratuvar kaynaklı enfeksiyonların en sık bilinen nedenleridir. Enfeksiyöz materyalle çalışan laboratuvar personellerinde diğer alanlarda çalışanlara oranla aktif pulmoner tüberküloz görülme sıklığının 3-9 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir. Laboratuvar kaynaklı tüberküloz olgularında enfekte insan materyali sıklıkla bulaş kaynağı olmaktadır. Aerosol üreten örnek veya kültürlerle yapılan işlemler laboratuvarda tüberküloz basilinin yayılımında en önemli risk faktörleridir. Aerolizasyon, en sık otopsilerde, enfekte doku ile yapılan frozen kesitlerinin hazırlanmasında ve sıvı kültürlerle yapılan işlemlerde ortaya çıkar. Çapı 5 μm'den küçük olan damlacıklar uzun süre havada asılı kalır ve solunarak alveollere ulaşabilirken daha büyük damlacıklar genellikle hızlı çökerek yüzeyleri, elleri ve giysileri kontamine ederler. Aerosolleri odadan uzaklaştırabilmek için saatte 6-12 kez hava sirkülasyonu sağlayabilen bir havalandırma sistemi ile 30-60 dakika süreyle havalandırma yeterlidir. Kontrolsüz sirkülasyona neden olabilen klima ve ventilatör gibi cihazlar TB laboratuvarlarında bulundurulmamalıdır.

TB laboratuvarlarında güvenli bir çalışma ortamı yaratmak amacıyla uygulamada birincil korunma ile enfektif ajanın laboratuvar çalışanından fiziksel olarak ayrılması sağlanır. Bu ayırma önlemleri arasında laboratuvar uygulamalarında teknik ve prosedürlere özen gösterme, biyogüvenlik kabini(BGK), güvenli santrifüj konteynırı ile kişisel koruyucu ekipman *(eldiven, maske, yüz örtüsü ve gözlük, koruyucu elbise)* kullanımı yer alır. İkincil korunma önlemleri olarak amaca uygun dizayn edilmiş ve alt yapısı düşünülmüş laboratuvar tasarımı, gerek laboratuvar çalışanlarının gerekse çevreyi korumada oldukça önem arzeder. Her laboratuvar çalışanının yararlanabileceği bir "biyogüvenlik rehberi" olmalıdır. Koruyucu ekipmanın seçiminde maskeden tuluma kadar birbiriyle uyumlu olmasına dikkat edilmelidir. Önerilen maskeler, hava ile solunabilecek mikron partiküllere karşı yüksek *(en az %98)* filtreleme etkinliğine sahip, CE işareti taşıyan ve ilgili Avrupa standardına *(EN149:2001)* göre test edilip onaylanmış maskeler*(Ör;N95, FFP2 veya FFP3)*olmalıdır. Tulum ve önlükler oldukça dayanıklı, hafif ve yumuşak, elyaf kumaştan üretilmiş, hava alabilen su bazlı sıvıların ve aerosollerin geçişine izin vermeyen, antistatik özelliğe sahip, 1.5 mikrondan büyük partiküllere karşı iyi bir bariyer özelliğe sahip olmalıdır. Mikobakteriyoloji laboratuvarlarında infekte materyalle çalışmalarda aerosol oluşumuna yol açabilecek tüm uygulamalar,

laboratuvar amacına uygun, sertifikalı, standart testleri yapılmış ve kalitesi uluslararası güvence altında olan Sınıf II veya III BGK'lerde ve uygun koruyucu giysiler giymiş personel tarafından gerçekleştirilmelidir.

TB Laboratuvarlarında Çalışan Personelin Uyması Gerekli Kurallar

Mikobakteri laboratuvarlarında çalışma sırasında oda kapısı sürekli kapalı tutulmalı (*negatif basınçlı odalar önerilir*), alana giriş çıkışlar sınırlandırılmalı, laboratuvar alanında hiçbir şey yenmemeli, içilmemeli ve sigara kullanılmamalıdır.

Personel, koruyucu ekipmanlarla donanımlı olarak çalışmalıdır. Balgam örneğinin bulunduğu kabı açarken, örneği alırken, yayma yaparken, kesici delicilerle çalışırken dikkatli olunmalı, enjektör kapağı kesinlikle tekrar kapatılmamalı ve biyogüvenlik kurallarına uyulmalıdır. Ağız ile pipetleme yerine mekanik pipetleme yapılmalı, kalem, etiket vb. laboratuvar malzemeleri ağıza sokulmamalıdır. Klinik örnekler ile yapılan tüm işlemlerde aerosol oluşturacak davranışlardan mümkün olduğu kadar kaçınılmalıdır.

Birincil bariyer olarak, kültür ve ilaç duyarlılığı çalışılan laboratuvarlarda aerosol oluşturması olası işlemler (*pipetleme, vorteksle homojenizasyon, boncuk ile süspansiyon hazırlama karıştırma, çalkalama ve aktarma gibi işlemler*) BGK içerisinde yapılmalı ve materyal vortekslendikten sonra 15 dakika durağan bırakılmalıdır. Çalışanlar için BGK içerisinde güvenli bir hava akımı oluşması amacıyla fan açıldıktan 15 dakika sonra çalışmaya başlanmalıdır. İşlem bittikten sonra kabin beş dakika daha çalıştırılarak, aerosollerin çıkmasına olanak sağlanmalıdır. Çalışma sırasında enfekte materyalle direkt temas durumunda ve çalışma bittikten sonra mutlaka eller su ve sabun ile yıkanmalı, takiben alkol bazlı bir el antiseptiği ile muamele edilmelidir. Kontamine olduğu düşünülen giysilerin dezenfeksiyonu amacıyla kontamine bölgeye yaklaşık 20-40 cm mesafeden alkol bazlı sprey dezenfektanlar püskürtülerek kullanılır. Güvenlik kabinleri dahil tüm çalışma yüzeyleri çalışma tamamlandıktan sonra dekontamine edilmelidir. Çalışma alanı gerektiğinde ve işlemler tamamlandığında 10-50 kat sulandırılmış TSE belgesine sahip sodyum hipoklorid solusyonu ile silinmelidir. Kontamine materyalin dökülmesi-sıçraması gibi kazalarda, kontamine alan ve çevresi havlu, önlük ya da 2-3 katlı gazlı bez gibi büyükçe bir örtü ile genişçe bir alan tamamen kaplanır. Örtü, 10 kat sulandırılmış çamaşır suyu ile ıslatılır. Yaklaşık 30 dakika bekletilir. Daha sonra mekanik temizlik yapılır, ardından bu alan aynı yoğunluktaki

çamaşır suyu ile bir kez daha silinir. Hasta materyali ile çalışırken kullanılacak atık kabına 1/10 veya 1/20 oranında sulandırılmış çamaşır suyu konmalıdır. İşlem sonrasında ortam ultraviyole ışığı ile dezenfekte edilmeli ve tüberküloz laboratuvarının enfekte atıkları otoklavlanarak atılmalıdır.

Laboratuvarda meydana gelen tüm kazalar derhal yetkili kişilere, sıklıkla uzman veya biyogüvenlikten sorumlu personele bildirilir. Kaza sonrası yapılacak takipte, öncelikli olarak infektif materyalin kazaya uğrayan personelden uzaklaştırılması ve gerekli ilk yardım uygulamasına geçmek olmalıdır. Daha sonra kaza ile ilgili sorgulama yapılmalı ve rapor tutulmalıdır. Kazaya uğrayan personelin infeksiyon riski dikkate alınarak profilaksi gereksinimi değerlendirilir ve gelecekte benzer kazaları engellemek amacıyla gerekli önlemler alınır ve takip edilir.

HASTANELERDE KORUNMA ÖNLEMLERİ VE PERSONEL TARAMASI

Aktif pulmoner TB'lu veya şüpheli olgulara hızla tanı konulması ve tedavilerinin başlatılması TB bulaşının önlenmesinde önemlidir. En sık bulaş, tanı öncesinde olmaktadır. Özellikle tanı konulmamış her TB olgusu toplumda ve hastanede bulaştırmayı sürdürmeye devam eder. Hastanede TB yayılımının önlenmesinde, özellikle yayma pozitif hastaların hastaneye yatışını takiben mutlaka izolasyonları gereklidir. TB şüpheli hastaların kesin tanıları konulana kadar TB hastası olarak kabul edilmeli ve onlarada gerekli izolasyon önlemleri uygulanmalıdır. TB hastalarının yatırılacağı tek kişilik izolasyon odası yok ise, TB hastaları ile TB dışı hastalar mutlaka ayrı odalarda tutulmalıdır. Bunun yanısıra dirençli hasta(lar) varsa bunlarda ayrı bir odaya alınmalıdır. Oda kapıları kapalı tutulmalı, negatif basınçlı oda yoksa odaların maksimum havalandırılması için pencereler olabildiğince açık tutulmalıdır.

Hastaların öksürük veya hapşırma sırasında ağızlarını kağıt bir mendille kapatmaları gerektiği ikaz edilmelidir. Odalarından çıkarken mutlaka cerrahi maske kullanmaları gerektiği bilinci verilmelidir. Mümkün olduğunca hastaların yakınları ile açık havada görüşmeleri sağlanmalı, ziyaret süreleri çok kısa tutulmalıdır. Bu görüşmeler sırasında hastaların maskelerini çıkarmamaları belirtilmeli ve izlenmelidir. Hasta çarşafları ile kullandığı tabak, kaşık ve bardağa normal yıkama işlemi uygulanmalı, yüzeylerin dezenfektanla muamelesi sağlanmalıdır. Hasta balgamı için örnek kapları tek kullanımlık olmalı ve işlem sonrası yakılarak imhası sağlanmalıdır.

TB'lu hastaların bulundukları ortamı havalandırmak ve bu ortamlara temiz hava sağlamak havadaki enfekte partiküllerin seyreltilmesini sağlar ve bulaşıcılığı azaltır. İzolasyon odalarının negatif basınçlı olması ideal bir yöntemdir. Fakat hem kurulumu hemde idamesi maliyetli bir uygulamadır. Bu odalarda kapı ve pencerelerde hava izolasyonu önemlidir. Odada saatte en az 6 kez hava değişimi sağlayacak bir havalandırma uygulanmalıdır. TB hasta odaları ve koridorlara UV lamba takılması (*her 20 metrekare alana 2 adet 15 Watt'lık UV-C lambaları)* veya UV içeren HEPA filtrelerden geçirilmiş temiz havanın tekrar odaya sirkülasyonunu sağlayan havalandırma sistemleri önerilmektedir.

Her türlü önleme rağmen bronkoskopi, balgam indüksiyonu, öksürük yaratan diğer işlemler, nebilizatör tedavi uygulamaları gibi yoğun basil içeren ortamlarda çalışması gerekli personel TB basillerini filtre edebilecek niteliğe sahip özel maskeler (N95 normunda) kullanmalıdır.

Ülkemizde sağlık çalışanlarında TB insidansının yüksek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle sağlık çalışanlarının peryodik taramalarının yapılması ve kaydı gereklidir. Başlangıçta tüberkülin cilt testi negatif olan personelin sonraki taramalarda pozitif hale gelmesi koruyucu tedavi gerektirir. Koruyucu tedavi öncesi aktif hastalık olmadığı gösterilmelidir. Taramalarda semptomların kaydedilmesi yanında mutlaka kaliteli akciğer filmleri çekilmelidir. Tüberkülin cilt testinin pozitifliğide şüphe uyandırır. Bu durumdaki kişilerin ARB yönünden üç kez balgamları incelenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Teles M.A., Kritski A.: Biosafety and Hospital Control. in: Palomino J.C., Leao S.C., Ritacco V (eds): Tuberculosis 2007 From basic science to patient care . First edition. BourcillierKamps.com. chapter 11, p:361-400, 2007

2. Siegel JD., Rhinehart E., Jackson M., Chiarello L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee: Guideline for isolation precautions: Preventing transmission of infectious agents in healthcare settings, p :41-73, June 2007

3. Özyurt M: Tüberkülozun yayılımını önlemede çevresel kontrol önlemleri ve dezenfeksiyon. Günaydın M., Öztürk R., Ulusoy S., Gültekin M. (edt.): 5.Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, Kongre Kitabı, Sayfa: 307-333, Antalya, 4-8 Nisan - 2007

4. Özyurt M: Laboratuvar kazaları ve bireysel korunma tedbirleri. 6.Ulusal Mikobakteri sempozyumu, Sempozyum Kitabı, Albay A, Kısa Ö (eds.), sayfa;43-57, 23-25 Kasım 2006, Kızılcahamam-Ankara
5. Uzun M: Su sistemleri ve çevreden izole edilen mikobakteriler ve bunların hastane infeksiyonları açısından önemi. 6.Ulusal Mikobakteri sempozyumu, Sempozyum Kitabı, Albay A, Kısa Ö (eds.), sayfa;97-104, 23-25 Kasım 2006, Kızılcahamam-Ankara
6. Ceyhan İ: Mikobakteri laboratuvarlarının fiziksel özellikleri. 6.Ulusal Mikobakteri sempozyumu, Sempozyum Kitabı, Albay A, Kısa Ö (eds.), sayfa;31-42, 23-25 Kasım 2006, Kızılcahamam-Ankara
7. Roth VR, Garrett DO, Laserson KF, Starling CE, Kritski AL, Medeiros EA, Binkin N, Jarvis WR. A multicenter evaluation of tuberculin skin test positivity and conversion among health care workers in Brazilianhospitals. Int J Tuberc Lung Dis. 2005 Dec;9(12):1335-42.
8. Yanarateş Ö: Havalandırma ve Klima Sistemlerinin Kontrolü Nasıl Yapılır? Nerelerde Laminar Akımlı Hava Kullanılmalıdır. 4. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, Kongre Kitabı, Günaydın M., Saniç A., Gürler B. (eds.), sayfa;602-607, 20-24 Nisan 2005, Samsun
9. Jensen P.A., Lambert L.A., Iademarco M.F., Ridzon R.: Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health care setting. Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Recomm. Rep.2005 Dec30;54(RR-17)
10. WHO: Practical Guidelines for infection control in health care facilities. SEARO Regional Publication No. 41, 2004
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Guidelines for Environmental infection Control in Health-Care Fascilities; Recommendations of CDC and the Healthcare Infectıon Control Practices Advisory Committee (HICPAC); 6-40; 2003
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Guidelines for Infection Control in Dental Health-Care Settings, 2003
13. Özkara Ş., Aktaş Z., Özkan S., Ecevit H.; Tüberkülozdan Korunma. Türkiye'de Tüberkülozun kontrolü için Başvuru Kitabı. T.C.Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı, ANKARA, sayfa; 58-64; 2003
14. Cuhadaroglu C, Erelel M, Tabak L, Kilicaslan Z: Increased risk of tuberculosis in health care workers: a retrospective survey at a teaching hospital in Istanbul, Turkey.BMC Infect Dis. 2002 Jul 26;2:14.
15. Kruuner A, Danilovitsh M, Pehme L, Laisaar T, Hoffner SE, Katila ML.Tuberculosis

as an occupational hazard for health care workers in Estonia. Int J Tuberc Lung Dis. 2001 Feb;5(2):170-6.
16. Alonso-Echanove J, Granich RM, Laszlo A, Chu G, Borja N, Blas R, Olortegui A, Binkin NJ, Jarvis WR. Occupational transmission of Mycobacterium tuberculosis to health care workers in a university hospital in Lima, Peru. Clin Infect Dis. 2001 Sep 1;33(5):589-96. Epub 2001 Jul 25.
17. Philips MS,von Reyn CF.: Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. Clin Infect Dis 2001; 33: 1363
18. Favero M.S., Bond W.W.: Chemical Disinfection of Medical and Surgical Materials. in: Block S.S (edt.) : Disinfection, Sterilization, and Preservation, 5.th. edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 881-918 , 2001
19. Fauerbach L.L., Janelle J.W.: Practical applications in infection control. in: Block S.S (edt.) : Disinfection, Sterilization, and Preservation, 5.th. edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 935-944, 2001
20. Wallace RJ Jr., Brown BE, Griffith DE.: Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks causede by non-tuberculous mycobacteria.Annu Rev Microbiol 1998; 52: 453
21. Kenyon TA, Ridzon R, Luskin-Hawk R, Schultz C, Paul WS, Valway SE, Onorato IM, Castro K. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis. Ann Intern Med. 1997 Jul 1;127(1):32-6.
22. Harries AD, Kamenya A, Namarika D, Msolomba IW, Salaniponi FM, Nyangulu DS, Nunn P.: Delays in diagnosis and treatment of smear-positive tuberculosis and the incidence of tuberculosis in hospital nurses in Blantyre, Malawi. Trans R Soc Trop Med Hyg.1997Jan-Feb;91(1):15-7.
23. Jereb JA, Klevens RM, Privett TD, Smith PJ, Crawford JT, Sharp VL, Davis BJ, Jarvis WR, Dooley SW.: Tuberculosis in health care workers at a hospital with an outbreak of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis Arch Intern Med. 1995 Apr 24;155(8):854-9.
24. van Eer MY, Kroon FP, van Furth R Prevention of nosocomial spread of multidrug-resistant tubercle bacilli. Neth J Med. 1994 Jun;44(6):220-6.0
25. Beck-Sagué C, Dooley SW, Hutton MD, Otten J, Breeden A, Crawford JT, Pitchenik AE, Woodley C, Cauthen G, Jarvis WR. Hospital outbreak of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis infections. Factors in transmission to staff and HIV-infected patients. JAMA. 1992 Sep 9;268(10):1280-6.
26. Pearson ML, Jereb JA, Frieden TR, Crawford JT, Davis BJ, Dooley SW, Jarvis WR.Nosocomial transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. A risk to patients and health care workers. Ann Intern Med. 1992 Aug 1;117(3):191-6.
27-Özkara Ş.:Sağlık Kurumlarında Tüberküloz Bulaşması ve Korunma. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı,Sayfa :243-250 , Samsun, 11-12 Haziran 2003

LABORATUVARDA ALINMASI GEREKLİ GÜVENLİK ÖNLEMLERİ

Mik. Uzm. Dr. İsmail Ceyhan
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı Şefi, Ankara

Tüberküloz (TB) aeresol yol ile bulaşan önemli bir enfeksiyon hastalığıdır. Enfeksiyonun doğal kaynağı akciğer tüberkülozlu hastanın kendisi olmakla birlikte dünyada çok sayıda laboratuvar kaynaklı vakalar da bilinmektedir. İnfektif dozun oldukça düşük olması (10 bakteriyel hücre) önemini arttırmaktadır. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ile çalışan TB laboratuvarlarında hastalanma riski diğer alanlarda çalışanlardan 3-9 kez daha fazla olduğu da unutulmamalıdır. TB klinikleri ve laboratuvarlarında önemli infeksiyon kaynaklarından biri de hastanın kendisidir. Hasta kliniğe muayene olmaya ya da laboratuvara materyal vermeye geldiğinde öksürme, aksırma ve hatta konuşma esnasında etrafa bol miktarda bakteri yayabilir. Bu nedenle buralarda çalışan kişilerin respiratuvar maske (N95, FFP2 veya FFP3) hastaların ise cerrahi maske takmaları korunma açısından en önemli önlemlerdendir.

TB laboratuvarına gelen her türlü materyal şüpheli hastalardan alındığı için olası MTB içerdiği kabul edilmeli ve önlemler buna göre alınmalıdır. Tüm laboratuvar personeli hem kendilerini hem de diğer kişileri enfeksiyondan korumak amacıyla bu önlemlerin alınması ve uygulanması konusunda bilinçli, bilgili ve dikkatli olmalıdır.

Her bir laboratuvar personeli öncelikle kendisinin ve yakın çalışma arkadaşının güvenliğinden sorumludur. Tüberküloz laboratuvarında çalışmaya başlamadan önce tüberkülin deri testi (ppd) ve akciğer filmi çektirmeli, laboratuvar yöntem ve prosedürleri için yeterli bilgi ve eğitimi almış olmalıdırlar. Ayrıca laboratuar koşullarındaki riskler bilinmeli ve bunlara karşı alması gerekli önlemler alınmalı ve ona uygun olarak davranılmalıdır. (Tablo.1).

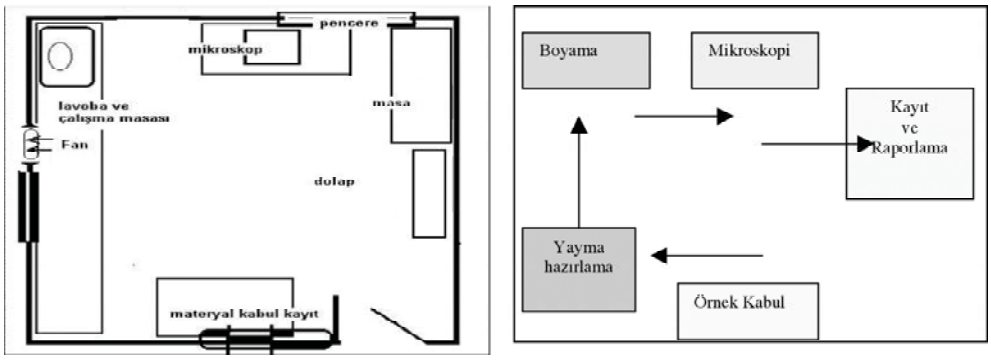
Tablo.1.TB laboratuvarlarında biyogüvenlik önlemleri	
1.	Laboratuvar alanlarında hiçbir şey yenmemeli, içilmemeli ve makyaj vb (lens değiştirme gibi) yapılmamalıdır.
2.	Ağız ile pipet kullanmamalı ve ağıza hiçbir şey (kalem, etiket, ibi) sokulmamalıdır.
3.	Kesici delici aletler ile çalışılırken dikkatli olunmalıdır.
4.	Laboratuvarda önlük giyilmeli ve önlük dış giysiler ile aynı yerde tutulmamalıdır.
5.	Eller laboratuvara girişte, önlük, maske vb. ekipman değiştirdikten ve özellikle şüpheli materyal ile temastan sonra veya çalışma sonunda uygun bakterisidal kimyasal bir madde veya sabunla yıkanmalıdır.
6.	Cihaz ve ekipmanların gerekli güvenlik önlemleri alınmadan temizlik, servis ve testleri yapılmamalıdır (Örneğin; Biyogüvenlik kabinlerinin test edilmesi veya filtrelerinin değiştirilmesi formol dezenfeksiyonu gibi uygun işlemlerden sonra yapılmalıdır).
7.	Tüm laboratuvar alanları ve çalışma yüzeyleri potansiyel olarak kirli kabul edildiğinden uygun dezenfektan ile temizlenmeli, atıklar steril (veya dezenfekte) edilmeden atılmamalıdır.
8.	Laboratuvar giriş ve çıkışlar kontrol altına alınmalı ve çalışma yapıldığı zamanlarda sınırlandırılmalıdır.
9.	Kültür ve ilaç duyarlılık çalışılan laboratuarlarda aerosol oluşturması olası işlemler BGK sınıf I veya BGK sınıf II içersinde yapılmalıdır.

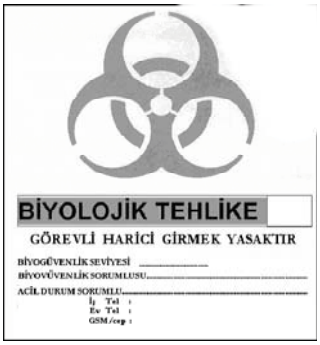
Laboratuvar Tasarımı, Kullanımı ve Önlemleri

Doğrudan mikroskopi yapan perifer laboratuvarları veya dispanserler çalışmalarını açık bankolarda yapabilirler. Ancak laboratuvar kayıt-kabul, çalışma alanı ve mikroskopi olmak üzere üç bölüme ayrılmalıdır. Laboratuvarda en az bir lavabo olması gerekli ve yeterlidir. Materyal akışı ve eğer düzenleme imkanı varsa hava akımı aynı yönde paralel olarak temiz alanlardan kirli alanlara doğru olması sağlanmalıdır (Şekil 1). Laboratuvarda kontrolsüz sirkülasyon (klima ve benzeri cihaz gibi) yapan cihazlar bulundurulmamalı ya da çalışma sırasında açık tutulmamalıdır. Dezenfeksiyon açısından yeterli ve uygun U.V. (Ultraviole lambalar) ile desteklenmelidir. Doğrudan mikroskopi yapan laboratuvarlarda aerosol oluşumu ve bulaş riski göreceli olarak düşük olduğundan kişisel korunma ekipmanları, önlemleri ve hijyen yeterlidir. Sterilizasyon için otoklav bulunması iyi bir seçenek olmakla birlikte kimyasal dezenfeksiyon ve otoklavsız sterilizasyon yapılabilir.

Mikroskopi laboratuvarı öncelikle yeterli fiziki alana sahip olmalıdır. Fiziki olarak iyi ve uygun aydınlatılmış 20–25 m^2 lik alan doğrudan mikroskopi yapan bir laboratuvar için yeterlidir. Daha dar ve çok geniş alanlar çalışma ve konfor açısından uygun olmaz. Duvarlar ve tavan düzgün, ancak kolaylıkla toz ve kir tutmayan, parlama ve yansıma yapmayan, su, kimyasal ve dezefektanlara dayanıklı malzemeden yapılmış ya da bu tür bir madde ile kaplı olmalıdır. Zemin kaygan olmayan mümkünse toz ve mikrop tutmayan özelikte, temizlenmesi, yıkanması ve dezenfeksiyonu kolay orta derecede hararete dayanıklı olmalıdır. Kapı kendiliğinden kapanan ve tercihen kilitlenebilir özellikte olmalıdır. Pencerelere sinek, böcek veya diğer haşeratın girmesini önleyecek malzeme takılmalıdır. Kapı üzerine biyolojik tehlike işareti konulmalı, seviyesi belirtilmelidir (Şekil 2).

Şekil 1. Doğrudan mikroskopi yapan mikobakteri laboratuarı tasarımı ve iş akışı





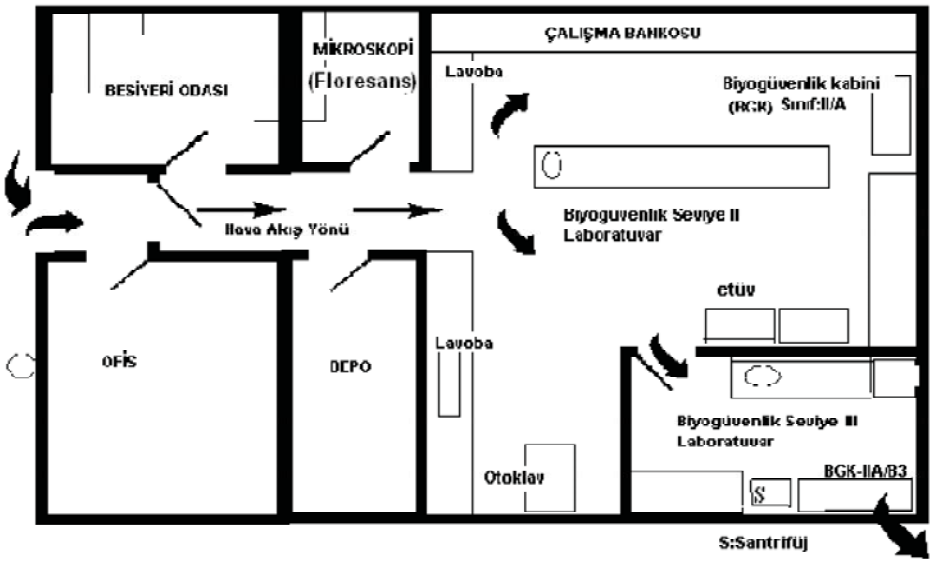
Şekil 2. Biyolojik Tehlike işareti

Kültür ve İlaç duyarlılık Çalışan Laboratuvarlar: Yalnızca kültür çalışan mikobakteri laboratuvarı alt yapı açısından minimum olarak Biyogüvenlik seviye-2 (BSL-2) olması yeterlidir. Ancak çalışmalar, uygulama ve teknikler açısından ise seviye 3 uygulamaları olmalıdır. Kültür yanında ilaç duyarlılık veya yoğun kültürel uygulamalar gerektiren işlemler (pasaj, biyokimyasal veya moleküler tiplendirme) yapılan laboratuvarlarda güçlendirilmiş Seviye 2 veya seviye 3 alt yapısı gereklidir. Seviye-3 laboratuvarı geçiş ve genel kullanım alanlarından uzak, ara ve geçiş alanları şekillendirilmiş ayrı olarak veya koridor sonu gibi kör noktalara yapılabileceği gibi seviye-2 ile birlikte de kurulabilir.

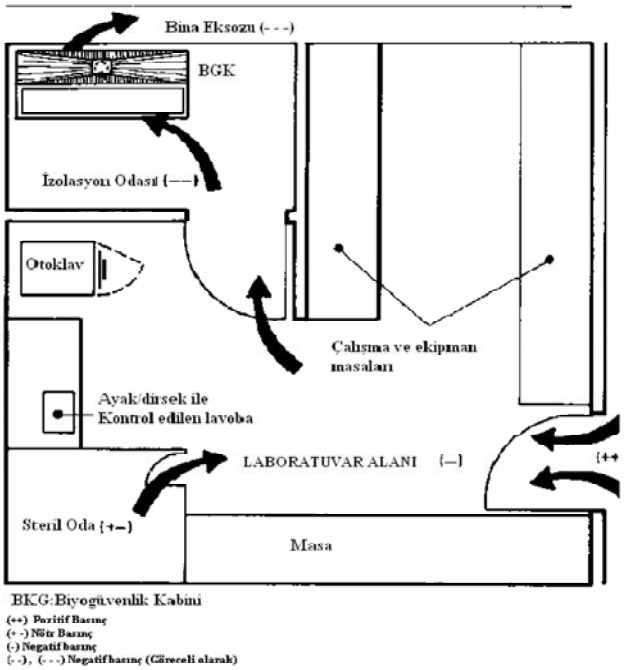
Kültür ve ilaç duyarlılık çalışılan laboratuvarlarda özel tasarım gerekir. Hava ve iş akışı amaca uygun temizden kirliye doğru düzenlenmelidir. Laboratuarda en az bir adet BGK (sınıf I veya II Biyogüvenlik Kabini) bulunmalı ve çalışma alanları yeterli miktarda ışıma ve dezenfeksiyon sağlayan U.V. lambaları ile desteklenmelidir. Kişisel korunma ekipmanları yanında aerosol oluşturan işlemler (pipetleme, vorteksleme, karıştırma, çalkalama, aktarma vb) mutlaka BGK leri

içersinde yapılmalı, santrifüjleme işlemi için ise özel olarak tasarlanmış aerosol korumalı santrifüjler kullanılmalıdır. Laboratuvar içersinde veya ulaşılabilecek bir yerde en az bir otoklav bulunmalı kirli materyal otaklavlandıktan sonra atılmalıdır.

Laboratuvar uygun ve yeterli alanlara sahip olmalıdır. Çalışma alanı için minimum 30m^2, negatif basınçlı (sirküle etmeyen ve içeride türbülans oluşturmayan ve temiz alanlardan kirli alanlara doğru tek yönlü hava akımı olan) bir alan yeterli kabul edilmektedir. Ayrıca bu alan içersinde daha güvenli 7-8m^2 lik daha fazla negatif basınçlı bir alan daha oluşturulabilir (Şekil 3-4). Besiyeri hazır olarak satın alınmıyor ise pozitif basınca sahip yaklaşık 12 m^2 lik, örnekler laboratuvarda kabul ediliyorsa 8 m^2 bir alan önerilmektedir. Sterilizasyon ünitesi yalnızca mikobakteri laboratuvarına ait ise yaklaşık 12m^2 lik bir alana ihtiyaç vardır. Etüv ve buzdolabı oda tipi olarak düşünülüyorsa etüv için 8m^2 buzdolabı için 6m^2 lik alan yeterli olur. Ayrıca ihtiyaç duyulacak diğer alanlar için uygun fiziki alanlar düşünülmelidir. Örneğin floresans mikroskopi için karanlık kapalı 4m^2 bir alan, depo için 15m^2 yeterli olabilir (Burada önerilen alanlar bir yaklaşım ve fikir vermesi açısından verilmiş olup standart olarak kabul edilmemelidir).



Şekil 3. Kültür ve ilaç duyarlılık testleri çalışan bir mikobakteri laboratuvar örneği.



Şekil 4. BSL-2 içersinde tasarımlanmış BSL-3 laboratuvarı örneği

Mikroskopi laboratuvarına benzer şekilde duvarlar ve tavan düzgün, toz ve kir tutmayan, parlama ve yansıma yapmayan, su, kimyasal ve dezefektanlara dayanıklı malzemeden yapılmış olmalıdır. Zemin kaygan olmayan, toz tutmayan düzgün anti bakteriyel kaplama (epoksi vb) özellikte, temizlenmesi, yıkanması ve dezenfeksiyonu kolay, asit, alkali gibi kimyasallara ve hararete veya ateşe dayanıklı olmalıdır. Duvar zemin ve tavanın yekpare ya da mikrop ve toz barındırmayacak yapıda olması, girinti, çıkıntı ve pürüz içermemesi önerilmektedir. Pencereler sabit olarak kapalı olmalı veya çalışma esnasında hava sirkülasyonunu bozacağından kapalı tutulmalıdır. Laboratuvara böcek veya diğer haşeratın girmesini önleyecek önlemler alınmalıdır. Kapı kendiliğinden kapanan ve kilitlenebilir özellikte olmalıdır. Laboratuvarda en az bir lavabo olması gerekli ve yeterlidir. Lavoba dirsek, ayak veya optik-sensörlü (harekete duyarlı) özelliğe sahip olmalıdır. Uygun miktarda ve dayanıklı malzemeden imal edilmiş çalışma masa ve dolapları olmalıdır. Biyogüvenlik kabini bulunması ve kullanılması zorunludur. İzolasyon odası; koridor, diğer çalışma alanları ve temiz oda (besiyeri odası gibi) alanlara göre negatif basınçlı olmalı ve oda içersinde kontrolsüz sirkülasyon (klima, vantilatör ve benzeri cihaz gibi) yapan cihazlar bulundurulmamalıdır. Tek geçiş hava akımı (BSL-2) veya uygun miktarda negatif

basınç oluşturulmalıdır (BSL-3). Laboratuvara minimum saatte 6 kez değişim sağalayacak mekanik havalandırma sistemi kurulmalıdır. Laboratuvar alanlarından atılan kirli hava tekrar laboratuvara veya genel kullanım alanlarına verilmemelidir. Ancak temizlenmiş/dezenfekte ve/veya steril olduğu kesinlikle garanti edilmiş hava kullanılabilir. Laboratuvar dezenfeksiyon açısından yeterli ve uygun U.V. (Ultraviole lambalar) ile desteklenebilir. Kişisel korunma ekipmanları (maske, önlük ve eldiven) ihmal edilmemelidir.

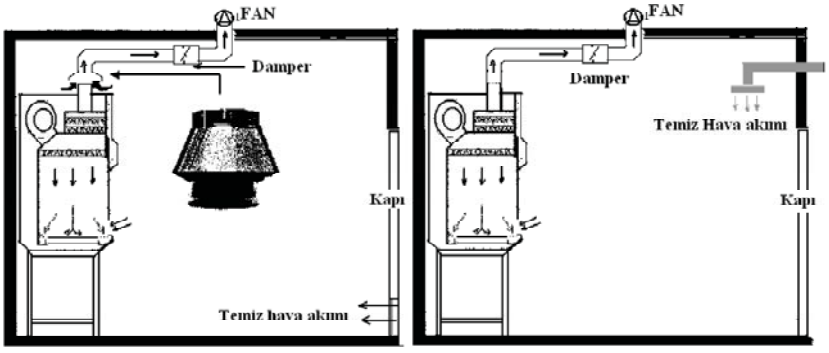
Kültür ve ilaç duyarlılık yapılan mikobakteri laboratuvarı (BSL-2 veya BSL-3 laboratuvarı) içersindeki biyogüvenlik kabinleri dış ortama veya bina eksozuna bağlanmalıdır. Bağlantı iki şekilde yapılabilir (Şekil 5). Yüksük bağlantı (thimble) adı verilen bağlantı tipinde eksoz hem oda içinden hem de kabin çıkışından oda dışına hava atar. Bu tür bağlantının en önemli avantajı oda içi basınç ayarlamasının kolay olmasıdır. Kabin ve ekzos fanının aynı açılması zorunlu değildir. Ekzos fanı kabinden önce, sonra veya aynı anda açılabilir. Ancak daha güvenli bir çalışma için ekzos fanı, kabin çalıştırılmadan 10–15 dakika önce çalıştırılmalı ve 10–15 dakika sonra kapatılmalıdır. Kabinin doğrudan dışarıya veya bina eksozuna bağlı olduğu durumlarda ise biyogüvenlik kabini ve ekzos fanı aynı anda çalıştırılmalıdır.

Doğrudan mikroskopi çalışılan laboratuvarlarda risk göreceli olarak düşüktür. Bu nedenle pahalı ve gelişmiş koruyucu ekipman alınmasına gerek yoktur. Ancak bu tür laboratuvarlarda kişisel koruyucu önlemler ve ekipmanlar yanında tasarım önem kazanır. İşlemler sırasında potansiyel risk prosedürler iyi bilinmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır (Tablo. 2.).

Tablo.2.Potansiyel risk ve aerosol oluşturan işlemler ve alınması gerekli önlemler			
Potansiyel risk taşıyan işlemler		**Doğrudan mikroskopi yapan laboratuvarlar**	**Kültür yapan laboratuarlar**
i)	Örnek kabının açılması.	Çalışma bankosunda, bunzen beki yanında	Biyogüvenlik kabini içinde
ii)	Preparat hazırlanması (Pipetleme yapılması ve materyalin aktarılması)	1. Pipetleme yapılmaz. 2. Preparat hazırlanırken öze ile veya tahta çubuk ile dikkatli ve yavaşça hazırlanır. Ani ve hızlı hareketlerden sakınmalı sıçratmamalıdır.	Biyogüvenlik kabini içinde
iii)	Santrifüjleme işlemleri	Santrifüjleme yapılmaz.	Biyogüvenlik önlemleri alınmış alanda ve aerosol korumalı santrifüjlerde
iv)	Vorteksleme, çalkalama, ezme vb işlemler	Bu işlemler yapılmaz.	Biyogüvenlik kabini içinde
v)	Enjektör içindeki materyalin boşaltılması	Zorunlu durumlarda maske giyilerek ve alev yanında çalışma bankosunda yapılabilir.	Biyogüvenlik kabini içinde
vi)	Liyofilize ampul açılması ve kültür tüplerinden pasaj veya ilaç duyarlılık için işlem yapılması	Bu işlemler yapılmaz.	Negatif basınçlı özel alanlarda ve Biyogüvenlik (Sınıf II) kabini içinde
vii)	Özenin yakılması	a. İçinde yıkanmış kum veya 3-5mm çaplı cam boncuklar bulunan kap(*) içersinde iyice temizlenip dezenfekte edildikten sonra akkor hale gelinceye kadar yakılır. Tahta çubuk kullanılıyor ise çubuk içinde dezenfektan olan atık kabı içine atılır ve daha sonra ya otoklavda ya da yakılarak sterilize edilir. b. Tek kullanımlık öze veya çubuklar kullanılabilir.	
(*)500-1000 ml'lik kapaklı erlen veya kavanozun 1/3'ü boncuk ya da temiz, yıkanmış kum, 2/3 ü alkol ile doldurulur. Erlen kolay alev almayacak şekilde ateşten uzakta ve kullanılmadığı durumlarda kapalı tutulur.			

Kültür ve ilaç duyarlılığı çalışılan laboratuvarlarda daha ileri tasarım, düzenleme, ekipman ve önlemlerin alınması zorunludur (Tablo.2 ve 3.).

Tablo.3.TB Laboratuvarlarının biyogüvenlik tasarım ve ekipmanları		
	Doğrudan mikroskopi yapan laboratuarlar	**Kültür yapan laboratuarlar**
Tasarım/alt yapı	1.Laboratuvar amaca uygun 3 bölüme ayrılmalıdır. 2.Laboratuvar da kullanılan önlük vb malzeme günlük malzemelerden ayrı tutulacak alan olmalıdır. 3.Materyal akışı ve hava akımı düzenlenmelidir 4.Lavabo olmalıdır. 5.Çalışma alanlarında direkt ve üst hava ışımalı UV[1] lambalar, Hasta odaları, bekleme salonları, muayene odalarında ise üst hava ışımalı UV lambalar ya da mekanik hava sirkulasyonu sağlayan kapalı U.V. cihazları bulunması tavsiye edilir.	1.Laboratuvar kirli ve temiz alanlar olarak iki ana bölüme ayrılmalıdır. Materyal akışı ve/veya hava akımı temiz alanlardan kirli alanlara doğru yönlendirilerek kontrol edilebilir düzeyde tutulmalıdır. 2.Laboratuvar da kullanılan önlük vb malzeme günlük malzemelerden ayrı tutulacak alan olmalıdır. 3.Lavabo olmalıdır. 4. Çalışma alanlarında direkt ve üst hava ışımalı UV lambalar, Hasta odaları, bekleme salonları, muayene odalarında ise üst hava ışımalı UV lambalar ya da mekanik hava sirkulasyonu sağlayan kapalı U.V. cihazları bulunmalıdır..
Güvenlik ekipmanları	**Maske**[2]:Maske zorunludur. Cerrahi maskeler koruyucu değildir. Ancak hastalara takılmalıdır. **Önlük:** Normal laboratuvar önlüğü yeterlidir. **Eldiven:** Plastik tek kullanımlık eldiven kullanılabilir.	**Maske:** Respiratuvar tip maske zorunludur. **Önlük:**Önü kapalı arkadan bağlanan özel tip önlük tercih edilmelidir. **Eldiven:** Plastik tek kullanımlık eldiven kullanılması zorunludur **Biyogüvenlik kabinleri**[3]:sınıf I veya Sınıf II tipte olmalı kullanılması zorunludur. **Santrifüj**[4]: En az 3000xg santrifügasyon sağlayan, Soğutmalı, kilitli ana kapaklı ve anti-aerosol biyogüvenlik korumalı sistemlerine sahip olmalıdır.
Sterilizasyon ve dezenfeksiyon	Yakma işlemi, etkili kimyasal dezenfeksiyon, kaynatma ve hijyen içeren temizlik yeterlidir. Otoklav zorunlu değildir.	Yakma işlemi, etkili kimyasal dezenfeksiyon, kaynatma ve hijyen içeren temizlik yanında, Otoklav zorunludur.
Dezenfeksiyon	Hipoklorit(%3-5 lik den 1/20-1/100 sulandırılmış) , %70-90 lık Alkol (etanol), Fenol (%2-5), Glutaraldehit(%2) kullanılabilir. 4'lü amonyum bileşikleri (zefiran veya sefril gibi) kullanılamaz	
(1)UV.Ultra-viole lamba. (2) N95, P2 veya P3 standartlarında (EN149) (3) EN 12469 veya eşdeğer standartlarında olmalıdır. (4) Hem kilitli kapaklı, hem de anti-aerosol korumalı tip olmalı, tüp gode kısımları burgu kapaklı ve çalışma yüküne uygun olarak en az 24 adet 50 ml'lik materyal tüpleri için uygun olması tercih edilmelidir.		



Şekil 5. Biyogüvenlik kabinlerinin bağlantı tipleri: Yüksük (thimble) tip (sol) ve doğrudan bağlantı (sağ).

Biyogüvenlik kabinleri(BGK)

Biyogüvenlik kabinleri (BGK) esas itibariyle çalışan personel ve çevreyi infeksiyöz aerosol ve sıçramalardan korumaya yönelik tasarımlanan hava akımı düzenlenmiş cihazlardır. 3 farklı sınıfı vardır. Bu cihazların en önemli iki özelliğinden biri amaca yönelik kontrollü hava akımı sağlaması diğeri ise hava içersindeki mikroskopik partiküllerin elimine edilmesidir. Eliminasyon BGK'lerindeki HEPA (High efficiency particulate air) adı verilen bir tür filtre sistem/leri tarafından sağlanmaktadır. Kültür ve ilaç duyarlılığı testleri çalışılan laboratuvarlarda bulunması zorunludur. Güvenlik kabininin özellikleri ile ilişkili olarak kullanım alanları farklıdır. Genel olarak BGK nin bazı temel özellikleri tablo 6.da gösterilmiştir. Tüberküloz laboratuvarlarında Sınıf I veya Sınıf II tipleri kullanılabilir. Sınıf I kabinler personel ve çevre korumaya yönelik olarak tasarımlanmıştır. Sınıf II kabinler ise bunlara ilave olarak ürünü de korurlar. Bu nedenle kültür laboratuarlarında Sınıf II BGK tercih edilmelidir. BGK'lerinin seçimi sırasında dikkat edilmesi gerekli iki önemli nokta bulunaktadır. Birincisi, BGK'leri çoğu zaman çoğu yerde laminair-flow olarak bilinen Temiz Çalışma kabinleri (TB: Clean Bench) ile karıştırılmaktadır. Buna dikkat edilmelidir. Çünkü Temiz Çalışma kabinleri yalnızca ürünü korumaya yönelik laminair-flow'lar olduğundan içersinde kesinlikle enfeksiyöz ve klinik örnekler gibi risk taşıyan materyaller çalışılamaz. BGK'leri ile aralarındaki bu önemli fark dolayısıyla klinik laboratuvarlarında kullanılmaları yarardan çok zarar getirir. Bu nedenle farklı amaçlar için tasarlanmış laminair-flowları birbirinden ayırt etmek çok önemlidir. BGK'leri ile TB'leri basitçe ayırımını yapmak için çalışma düzeyi ve yüzeyine duman veya tütsü tutulabilir: dumanı içeri çekiyor ise BGK, dışarı kaçırıyor veya taşırıyor ise TB'dir. İkinci önemli nokta kabinin uygun standartlarda olduğu test edilmeli veya ettirilmelidir. Çünkü bugün dünyada çok sayıda Avrupa (EN12469) veya eşdeğeri diğer uluslararası ya da ulusal standartlarda ve sertifikaya sahip olmasına rağmen son derece yetersiz ve en basit testleri bile geçemeyen son derece yetersiz kabinler bulunmaktadır. Bu nedenle Biyogüvenlik kabini laboratuar koşullarında akredite veya bağımsız bir test kuruluşuna test ettirilmelidir.

Hemen hemen hiçbir kabin yapısal olarak tek başına %100 koruyuculuğa sahip değildir. Özellikle Sınıf I ve Sınıf II kabinlerde koruma ve korunmanın istenilen düzeye yükseltilmesi doğru monte edilmesi ve uygun şekilde kullanılması mümkün olabilir. Kabinler laboratuvar içersinde geçiş trafiği olmayan kapı ve pencerelerden (Pencereler çalışma sırasında kesinlikle kapalı tutulmalıdır) ve hava

sirkülasyon yolundan uzak noktalara yerleştirilmelidir. TB laboratuvarlarında kullanılan BGK'lerinin fan ile güçlendirilmiş thimble/canopy bağlantı denen bağlantı modeli ile bağlantılarının yapılması oda içersinde yeterli seviyede düşük basınç oluşmasına ve daha güvenli çalışma ortamı oluşturulmasına yardım eder. Ayrıca sınıf II kabinlerin doğru kullanımı bulaş riskini önemli ölçüde düşürür.

Çalışma sırasında uyulacak kurallar:

a) Kabin çalışma yüzeyindeki hava delikleri kapatılmamalı ve hava akımını bozacak gereğinden fazla malzeme kabin içersine konulmamalıdır.
b) Kabinde çalışma yapılırken etrafta dolaşılmamalı, kapı ve pencereler kapalı tutulmalıdır.
c) Kabin içersinde çalışıma yaparken eller dışarı çıkarılmamalı veya bu işlem minimize edilmelidir. Bu durumda çalışmaya tekrar başlamak için eller içeriye sokulduktan sonra 2-3 dakika beklenmelidir.
d) Kabin içersinde bunzen beki kullanılmamalıdır. Mikro-insineratör veya tek kullanımlık öze kullanılmalıdır.
e) Kabin çalışmaz durumda ve güvenli hava akımı oluşmadığı/olmadığı durumlarda kullanılmamalıdır.
f) Çalışma başlamadan önce çalışmanın tüm ayrıntıları gözden geçirilmeli, planlanmalı ve gerekli malzemeler önceden hazırlanmalı ve kabin içersine konması gerekli olanlar belirlenerek yerleştirilmelidir.
g) Çalışma yüzeyine dezenfektan emdirilmiş ped yerleştirilmelidir.
h) Kabin açıldıktan sonra yaklaşık 15 dakika beklenerek hava akımının güvenli duruma gelmesi sağlanmalıdır.
i) Kabin ön cam açıklığı güvenli pozisyondan daha az veya daha çok açılmamalıdır.
j) Kabin çalışma bitiminden sonra kirliler dezenfeksiyon veya sterilizasyon amacıyla uygun şekilde kabinden uzaklaştırılmalıdır.
k) Kabin en az 5 dakika daha çalıştırılmalıdır.
l) Daha sonra kabin içi temizlenmeli ve dezenfekte (%70lik alkol veya %0.5-1 lik sodyum hipoklorit (NaOCl)-ev tipi çamaşır suyu 20-50 kat sulandırılarak hazırlanabilir) edilmelidir. NaOCl ile dezenfeksiyon yapıldığında (NaOCl aşındırıcı olduğu için) çalışma yüzeyi %70 lik alkol veya su ile tekrar silinmelidir.

Ultra-viole (U.V.) lambalar

Direkt ve üst hava ışımalı olarak kullanılabilirler. En etkili UV'ler dalga boyu 254 nm (nanometre) olan UV-C tipleridir. Yararlı ömürleri teknik özelliklerinde belirtilmemiş ise yaklaşık 2500-3000 saat arasında değişir. Bundan dolayı daha uzun süre kullanılması yarar getirmez. Teknik olarak kontrol edilmeli ya da üretici firma güvencesi aranmalıdır. UV lambaların penatrasyon özelliği olmadığı için diğer dezenfeksiyon işlemleri ile birlikte kullanılmalıdır. Lambalar reflektör içinde yerden 210 cm yukarıda duvara monte edilmiş olmalıdır. Reflektörlü/korunmuş UV lamba altında çalışmak zararlı değildir. Ancak direkt ışımalı UV lamba altında korumasız halde çalışmak veya bulunmak zararlı ve tehlikelidir. Üst hava ışımalı UV lambalar hava dezenfeksiyonu sağlarken, direkt ışımalı olanlar hem hava hem de yüzey dezenfeksiyonuna yardım ederler. Teknik olarak direkt ve üst hava ışımalı UV lambalar, reflektöre hareket kabiliyeti sağlayan (reflektör üst ve alt kısımlara kolaylıkla hareket edebilir) pratik bir tasarımla birleştirilmişlerdir. Böylece bir UV lamba hem direkt hem de üst ışımalı tipte kullanılabilir. Bir odaya yerleştirilecek UV lamba adedi odanın boyutlarına göre değişir (Tablo.4). Lambalar kısa zamanda toz tuttuğu için 2-4 haftada bir %70 alkollü bez ile silinmelidirler.

Yüzey dezenfeksiyonu gerektirmeyen alanlarda, örneğin tüberkülozlu hasta odaları, muayene odaları ya da hasta bekleme salonları gibi genel kullanım alanlarında mekanik hava sirkülasyonu sağlayan kapalı U.V. lamba içeren özel tasarlanmış cihazlar kullanılabilir.

Tablo.4. Laboratuvar boyutlarına göre takılması gerekli üst hava ışımalı UV lamba adetleri

Tavan yüksekliği: 2.7-3m		**Oda uzunluğu:3-4 m Genişliği: 3-4 m**	**Oda uzunluğu:3-4 m Genişliği:5.5-7m**
Personel en fazla 8 saat ışıma altında	%90 hava dezenfeksiyonu için:	1adet 15 Watt (W)	3 adet 15 W veya 1 adet 30 W veya 1 adet 40 W
	%99 hava dezenfeksiyonu için:	2 adet 15 W veya 1 adet 30 W	6 adet 15 W veya 2 adet 30 W veya 2 adet 40 W

Personel Koruyucu ekipmanlar:

Biyogüvenlik kabinleri %100 etkili veya koruyucu olmadıkları için özellikle iyi seçilmiş maske, önlük ve eldiven gibi diğer personel koruyucu giysiler ile birlikte kullanılmalıdırlar. Maskeler respiratuvar tipte, 0.5-1.0.m büyüklüğündeki partiküller için %90 dan fazla koruyucu özellikte N95 veya P2 ya da daha iyisi P3 (EN149-FFP2, EN149 FFP3 veya N95) standartlarında olmalıdır. Ayrıca tek kullanımlık plastik muayene eldiveni kullanılmalıdır.

Her çalışma da mutlaka önlük giyilmelidir. Önlük ve diğer giysiler hiçbir zaman aynı yerde (dolap vb) saknmamalıdır. Laboratuvarda otoklavlanabilir ve/veya değiştirilebilir ayakkabılar kullanılması uygundur. Kullanılan koruyucu giysiler U.V. lamba altında 1-2 saat tutulmalıdır. Yıpranmış ve kullanılamayacak durumda olan koruyucu malzemeler kapalı kap ya da otoklavlanabilir poşetler içersinde sterilize edildikten sonra atılır. Belirgin şekilde kirlenen ancak tekrar kullanılabilecek durumda olan malzemeler benzer şekilde sterilize edildikten sonra kullanılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Chosewood, L,C., Wilson,D.E., (Eds) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Fifth edition. 2007
2. CDC Primary Contaminment for Biohazards: Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets 2nd Ed. 2000
3. Ceyhan, İ., Biyogüvenlik laboratuvar seviyeleri ve Biyogüvenlik Kabinleri Seçimi Kullanımı ve Bakımı., 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 20-24 Nisan 2005 Samsun
4. Ceyhan, İ., Ülkemize Uygun Tüberküloz laboratuvar Yapılanması 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, 11 –12 Haziran 2003. Samsun
5. Fleming, D. O., Richardson, J.H., Tulis, J.J. and Vesley, D. (Eds) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Appendix-I). p:293-354 in:Laboratory Safety. Principles and Practices. ASM Press, 1995
6. Harding, L. and Liberman, D.F., Epidemiology of Laboratory-Associated Infections. Fleming, D. O., Richardson, J.H., Tulis, J.J. and Vesley, D. (Eds). p:7-15 in: Laboratory Safety. Principles and Practices. ASM Press, 1995
7. Sewell, D.L., (1995) Laboratory-Associated Infections and Biosafety, Clin Microbiol Rev 8:3 389-405
8. WHO, (2004). Laboratory Biosafety Manual Third Edition WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11

ETKİNLİĞİ ARAŞTIRILAN YENİ İLAÇLAR

Doç. Dr. Vildan AVKAN OĞUZ
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakteriyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Tüberküloz (TB) hala en tehlikeli toplum kaynaklı kronik bir hastalıktır. Son on yılda çok ilaca dirençli tüberküloz (MDR-TB)'dan daha dirençli Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TB) suşlarının tanımlanması ve bu suşlarla Güney Afrika'da ortaya çıkan son salgında çoğu HIV ile infekte 53 olgunun 52'sinin ölmesi, tüberküloz (TB) olgularının tanısından tedavisine yeni arayışların aciliyetini vurgulamaktadır. Dünyada 90 ülkede MDR-TB ve Sovyet Rusya, Asya ülkeleri başta olmak üzere en az 28 ülkede XDR-TB olgularının varlığı bildirilmektedir (1). Latvia MDR-TB olguları en yüksek olan ülkelerden biridir ve MDR-TB olgularının % 19'u XDR-TB kriterlerine sahiptir (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ilaç dirençli TB'u tedavi etmek için her yıl 650 milyon dolara ihtiyaç olduğunu belirlemiştir. Ancak bu maliyete karşın tedavide en önemli problem hastaların tedaviye uyumunun sağlanmasıdır. Tedavi uzun sürelidir ve birden fazla ilaç kullanımın getirdiği sorunlar hasta uyumunu zorlaştırmaktadır. Hastalar daha tedavinin ilk ayında kendini daha iyi hissetmekte ve ilaçları düzensiz kullanmaya başlamaktadır. Tedavi 1960-1970'li yıllarda yeni ilaçların kullanıma girmesi ve daha sonra direkt gözlem altında tedavi uygulanması ile 24 aydan 6 aya kadar kısalmakla birlikte problem çözülmüş değildir. Direnç ve hasta uyumu başta olmak üzere bu sorunlara yanıt aramak, tedavi süresini kısaltmak ve yeni ilaç geliştirmek amacıyla 8 Şubat 2000'de Güney Afrika Cape Town'da DSÖ, Dünya Bankası, Centers for Diseases Control (CDC) ve 120'den fazla uluslararası kurum, fon ve dernek temsilcilerinin katılımı ile oluşturulan 'The Global Alliance for TB Drug Development (TB Alliance)' müttefikliği sonucu "Cape Town Bildirisi" oluşturuldu. TB Alliance, riskleri ve olumlu sonuçları paylaşmak üzere tasarlanmış kar amacı gütmeyen bir ortaklıktır. Hazırlanan bildiride yeni ilaç geliştirme çabalarının motivasyonu ile, tedavi süresinin daha da kısaltılması, özellikle HIV+TB birlikteliği olan olgularda ilaç etkileşimlerinin irdelenmesi ve gelişmekte olan ülkelerde latent TB infeksiyonu (LTBI) kontrolü ile hastalığın tedavisinin basitleştirilmesi amaçlanmaktadır (2-4).

Son zamanlara kadar TB'a karşı yeni ilaç geliştirme çabası azdı ve ilaç sanayinde yeni bir TB ilacı geliştirmek için yeterli ödenek ayrılmıyordu. Sadece küçük biyoteknoloji şirketlerinin aktif bir çabası vardı. En son rifamisinler TB tedavisinde kullanılmak üzere 1971 yılında Food and Drug Administration (FDA) onayı aldı. Son 30 - 40 yıldan beri farklı bir etki mekanizmasına sahip güçlü bir TB ilacı klinik kullanıma girmedi. Yeni bir TB ilacı geliştirmenin maliyeti de 115-240 milyon dolar olarak tahmin edildi ve TB Alliance sonrası ilk destek Rockefeller vakfı tarafından yapıldı. Bunu Bill ve Melinda Gates vakfı izledi ve TB Alliance ortakları beş stratejik hedef saptadı.

1. Ümit veren bileşiklerin değerlendirilmesi ve tanımlanması
2. Aday olan yeni ilaçların klinik öncesi geliştirilmesi ve denetlenmesi
3. Yeni ilaçlarla ilgili klinik çalışmaların düzenlemesi ve onayı
4. İlacın maliyetinin karşılanabilirliği, ilacın kabul görmesi ve ulaşılabilirliğinin ölçümü Affordability, Adoption and Acces (AAA) stratejisi
5. TB ilaç gelişimi için uzmanların harekete geçirilmesi ve kaynak sağlanması.

Bu aşamadan sonra TB yeni ilaç üretim aşaması hareketlendi ve *Mycobacterium tuberculosis* genom dizisinin tanımlanması ile bakterinin yapısında bulunan gruplar veya biyokimyasal reaksiyonlarda rol oynayan enzimler gibi pek çok yeni hedef, yeni bir TB ilacı geliştirmek amacıyla seçildi. Bu hedefler arasında arbinogalaktan, peptidoglikan, mikolik asit gibi hücre duvar biyosentezi, aminosit biyosentezi ve bazı kofakförlerin (folik asit, pantotenik asit, riboflavin, CoA) biyosentezleri bulunmaktadır. Hedefler ile yapılan çalışmalarda invitro veya invivo değişik derecelerde başarı sağlanmış ve daha ayrıntılı değerlendirmeler sonucu öncelik sırasına göre, üretici tarafından yapılan ama henüz kullanıma girmeyen ürünler ortaya çıkmıştır. (3, 5, 6). Mart 2005'te global TB ilaçlarının üretici tarafından yapılan ama henüz kullanıma girmeyen ürünleri tablo 1'de sunulmuştur. Son birkaç yılda TB Alliance tarafından bildirilen yeni ilaçlar için aday bileşikler ise şunlardır (3)

1. Nitroimidazoller : Potansiyel sterilizan aktivitesi ve MDR-TB karşı etkinliği söz konusudur.
2. Uzun etkili rifamisinler : Antiretroviral ilaç etkileşimleri ve diğer rifamisinlere çapraz dirençten kaçınma potansiyeline sahip özellikleri ve uzun etkileri ile aralıklı tedavi uygulamalarında araştırılmaktadır.

3. Makrolidler : Farmakolojik özellikleri ve *M. tuberculosis*'e karşı antibakteriyal aktiviteleri nedeni ile potansiyel tüberküloz ilaçları arasındadır.
4. Oksazolidinonlar : Antimikobakteriyel aktiviteye sahip dar spektrumlu ajanlardır. Fare modeli ile yapılan hayvan çalışmalarında izoniyazide benzer aktivite gösterir. Invitro çalışmalarda *M. tuberculosis* için Linezolid'in MIC_{90} değeri 1-2 mg/L'dir. Duyarlı suşlar, MDR-TB suşları ve *M. tuberculosis* dışı mikobakterilere karşı etkinliği bildirilmekle birlikte klinik kullanım henüz sınırlıdır. Erişkinde 2x600 mg/gün <28 gün süre ile kullanımı iyi tolere edilir. Uzun süre kullanımda geri dönüşümlü hemopoietik supresyon, trombositopeni ve nöropati ortaya çıkabilir (7). Son zamalarda ikinci kuşak antitüberküloz ilaçlar arasında kullanımı artan Linezolid'e karşı MDR-TB suşları arasında % 1,9 oranında direnç bildirildi Direnç mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte dirençli suşlarda herhangi bir mutasyon saptanmadığı açıklandı. Dirençte eflüks pompa inhibitörlerinin olası etkilerinin rolü olabileceği ima edildi. (8).
5. Pleuromutilinler : Doğal ürün kaynaklı yeni sınıf bir antibiyotiktir. İlk çalışmalarla antitüberküloz etkinliği olduğu, çapraz direnç göstermediği ve çok yavaş direnç geliştiği belirlendi.
6. Piroller : İn vitro ve yeni etki mekanizması ile hayvan modellerinde antimikobakteriyel etkinliğe sahip yeni sınıf bileşiklerdir.
7. Florokinolonlar : Bu bileşiklerden 8–metoxy-fluoroquinolon olan gatifloksasin ve moksifloksasin ile yapılan çalışmalar, bu bileşiklerin en fazla ümit verdiğini ve tedavi süresinin kısaltılmasında anahtar rolü oynayabileceklerini gösterdi.

Yeni keşfedilen bileşikler	Nitroimidazol analogları Karboksilatlar Kinolonlar Makrolidler Pleuromutilinler Isocitrate Lyase (ICL) Inh A Odaklanmış taramalar Metiltransferaz inhibitörleri Tarama / hedef tanımlanması
Klinik öncesi test aşamasındaki bileşikler	Nitroimidazole PA-824 Pyrole LL 3858 SQ-109
Klinik testler uygulananlar bileşikler	Moksifloksasin Diarylquinolone R207910 Properietary Compound Gatifloksasin

Tablo 1: Mart 2005'te global TB ilaçlarının üretici tarafından yapılan ama henüz kullanıma girmeyen ürünleri (Gardner CA,2005)

Cape Town Bildirisi sonrası nispeten kısa bir sürede, bu ürünler içinden yedi gelecek vaad eden bileşik klinik denemeye alındı (Tablo 2).

Yeni bileşikler	Çalışma fazı	Destekleyen kuruluşlar
Gatifloksasin	Faz III	European Commission /OFLOTUB consortium, Institut de Recherche pourle développement, WHO TDR, Lupin
Moksifloksasin	Faz II / III	Bayer, TB Alliance, CDC, University Collage of London, Johns Hopkins University
TMC 207	Erken bakterisidal aktivite	Johnson and Johnson (Tibotec)
OPC – 67683	Erken bakterisidal aktivite	Otsuka Pharmaceutical Co.,Ltd.
PA – 824	Faz I	TB Alliance
LL – 3858	Faz I	Lupin Ltd.
SQ – 109	Faz I	Sequella Inc.

Tablo 2 : Etkinliği araştırılan yeni bileşikler

GATİFLOKSASİN : Direnç saptanmayan suşlarla infekte akciğer TB'lu olguların tedavisi amacıyla geliştirilmiştir. Afrika'da çok merkezli, faz III, randomize kontrollü bir çalışmada; iki ay süre ile hergün İzoniyazid+Rifampisin+Pirazinamid+Gatifloksasin kullanımının ardından, iki ay süre ile haftada üç kez İzoniyazid+Rifampisin+ Gatifloksasin kullanılarak uygulanan toplam dört aylık tedavi şeması, standart altı aylık birinci kuşak ilaçların kullanıldığı tedavi ile karşılaştırılmıştır. Etkinlik için olgular tedavi bitiminden itibaren iki yıl süre ile izlenmiş ve olgularda disglisemi riskinin diğer florokinolon kullanılanlara göre daha fazla saptanması nedeniyle, gatifloksasin kullanımının Kanada ve Amerika'da diabetes mellituslu olgular için kontrendike olduğu belirtilmiştir (Şubat 2006).

MOKSİFLOKSASİN : İki farklı kombinasyon rejimi ile test edilmiştir. Hayvan modeli ile yapılan ilk çalışmada; standart tedavi rejiminde etambutol'ün yerine moksifloksasin kullanılarak balgam kültür konversiyonunun standart tedaviden 4-6 hafta daha erken ortaya çıktığı gösterilmiştir. Yeni tanı alan TB olgularının tedavisinde etambutol yerine moksifloksasin kullanım çalışmaları İspanya, Güney Amerika ve Afrika'da yapılmaktadır. İkinci fare modeli ile yapılan çift kör, randomize, kontrollü faz II çalışmada ise standart tedavide izoniyazid yerine moksifloksasin kullanımı değerlendirmesi sürmektedir. Bu her iki rejimin faz III çalışmasına başlanması 2007'nin ikinci yarısında planlanmaktadır. Moksifloksasin içeren rejimlerle ilaç duyarlı aktif TB olgularında dört aylık tedavinin etkinliği ve güvenirliliği, standart altı ay süren tüberküloz tedavisinden daha az değildir (2). Bu veriler kombinasyon rejimlerine moksifloksasinin eklenmesi ile TB tedavi süresinin kısalabileceğini vurgulamaktadır.

TMC207 (TİBOTEC) : İnvitro dirençli veya duyarlı *M. tuberculosis* suşlarına etkili diarylquinolin'dir. TB için yeni bir ilaç sınıfıdır. Basilin ATP sentazını inhibe eder. İnvitro ve fare modelinde invivo aktivitesi oldukça etkili olmasına karşın birinci kuşak tüberküloz ilacı olarak kullanılması için bazı sakıncaları vardır. Örneğin Sitokrom P450 3A4 enzimi ile metabolize olduğundan rifampisin ile birlikte kullanımı sonucu serum konsantrasyonunun yaklaşık % 50 oranında azaldığı belirtilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada tedavinin en az ilk dört günü için erken bakterisidal aktivitesinin izoniyazid veya rifampisin ile karşılaştırıldığında minimal olduğu ve tedavinin 5-7. gününde 400 mg/gün TMC207 kullanımı ile,

bu aktivitenin izoniyazid veya rifampisin ile benzer olduğu bildirilmiştir. Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmalarla güvenli ve tolere edilebilir bir ilaç olduğundan gelecekte MDR-TB olgularında faz II çalışmaları planlanmaktadır (2).

OPC-67683 ve PA-824 : Her iki bileşik nitroimidazol grubudur. OPC-67683 nitroimidazo-oxazole ve PA-824 nitroimidazo-oxazine bileşiğidir. OPC-67683'ün faz I güvenlilik, tolerabilite, farmakokinetik testleri ve 400 mg kullanımı ile ilk 7 gün içindeki erken bakterisidal aktiviteyi değerlendiren çalışmaları tamamlanmıştır. Erken bakterisidal etki çalışmaları kullanılan ilaç dozu ve katılan merkez sayısı arttırılarak 14 güne uzatılıp standart dört-ilaç kontrol rejimi ile birlikte Güney Afrika'da sürmektedir. PA-824'ün de güvenlilik, tolerabilite, farmakokinetik testleri yapılmış ve 14 gün süre ile ilacın erken bakterisidal aktivitesini değerlendirilecek çalışmaların Güney Afrika'da yapılması planlanmaktadır (2). PA-824 TB Alliance tarafından 2002 Haziran'da kazanılan ilk bileşiktir. Bakterisidal aktivitesi izoniyazid'e benzer, sterilizan aktivitesi rifampisinin aktivitesine rakiptir. İlaç duyarlı ve MDR-TB suşlarına karşı etkilidir. Toksikolojik çalışmalarda teratojenik ve toksik etkisi gösterilememiştir (3). Her iki bileşiğin etkin dozu ve en fazla tolere edilen dozu arasındaki kabul edilebilir terapötik aralık saptanmıştır. Çalışmalar, daha uzun süre etkinliğin varlığını ve bileşiğin kombinasyon rejimi içindeki yerini gösteren denemeler ile faz II çalışmalarına geçilerek devam edecektir.

LL-3858 (SUBOTERB) : Yeni bir pirol'dür. Bu bileşiğin fare modelinde standart birinci kuşak ilaçlar ile kombinasyon tedavisi içinde kullanılmasıyla, akciğer ve dalaktaki sterilizan etkinin, sadece standart birinci kuşak ilaçların kullanılmasına göre, daha kısa sürede ortaya çıktığı saptanmıştır. İlacın birden fazla doz uygulaması ile faz I klinik değerlendirmesi sürmektedir.

SQ-109 : Hem izoniyazid hem de rifampisin ile sinerjik etkili olduğuna inanılan ethylenediamine'dir.

Yeni bir TB ilacının geliştirilmesinde faz I çalışmaları için en az bir yıl, faz II için iki yıl ve faz III için üç yıl olmak üzere en az altı yıl gereklidir. İlacın etkin ve güvenli olduğunun gösterilmesi dışında, bu ilacın diğer tübeküloz ilaçları ile

etkileşimi ve kombinasyon içindeki yerinin araştırılması süreyi yirmi yılın üzerine çıkarmaktadır. Sürenin uzamasına ek olarak maliyet de artmaktadır. TB Alliance global marketin, birinci kuşak tüberküloz ilaçları için yaklaşık 315 milyon dolar, ikinci kuşak ilaçlar için 54 milyon dolar olduğunu bildirmektedir (9). Sonuçta yeni rejimlerin geliştirilmesi hem insan gücü hem ekonomik kaynak gerektirir. Kaynak sağlandığında bile bakterinin üreme zamanının ve tedavisinin diğer bakterilere göre daha uzun olması, yeni ilacın farklı araştırmalarla etkinliğinin gösterilebilmesi için nispeten fazla sayıda olgu ihtiyacı ve olguların uzun süre izlemi, etkinliği araştırılan ilaç gelişimine katkıda bulunan güçleştirici faktörlerdir. Planlama, ilacın ihtiyacı olan kişilere ulaştırılması, toplumun eğitimi de başarıda rol oynamaktadır. Önerilen, ulusal tüberküloz kontrol programları ile yeni ilaç gelişimine katkıda bulunan firmalar arasında sürekli bilgi paylaşımının sağlanmasıdır.

KAYNAKLAR

1. http//newtballiance.org/downloads/inthenews/2007/USA_Today.3,5.o7pdf Bağlantı tarihi : 7.9.2007.

2. Ginsberg AM, Spigelman M. Challenges in tuberculosis drug research and development. Nature Medicine. 2007; 13 (3): 290-294.

3. Gardner CA, Acharya T, Pablos-Méndez A. The Global Alliance for Tuberculosis Drug Development-Accoplishments and Future Directions.Clin Chest Med 2005; 26:341-347.

4. http://new.tballiance.org/downloads. The Cape Town Decleration. Bağlantı tarihi: 7.9.2007

5. Mdlui K, Spigelman M. Nover targets for tuberculosis drug discovery. 2006;6:459-467.

6. Spigelman M, Gillespie S. Tuberculosis drug development pipeline: progress and hope. Lancet 2006;367:945-947.

7. Fort_n J, Martín- Dávila P, Navas E, Pérez-Elías MJ, Cobo J, Tato M, et al. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Antimicrob Agent Chemother 2005; 56: 180-185.

8. Richter E, Rüsch-Gerdes S, Hilleman D. First Linezolid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agent Chemother 2007; 51(4):1534-1536.

http://new.tballiance.org/downloads/publications/Pathway_to_patients_compendium_FINALpdf. bağlanma tarihi 4.9.2007.

TÜBERKÜLOZ AŞILARI

Prof. Dr. Seyyal ROTA
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

Tüberküloz halen dünyamızdaki en büyük sağlık sorunlarından biri olmayı sürdürmektedir. Dünya nüfusunun 1/3ünün tüberküloz riski altında olduğu bilinmektedir. Halen bütün dünyada 2 milyar kişinin tüberküloz ile enfekte olduğu ve yılda 8-10 milyon yeni olgu olduğu tahmin edilmektedir. 2 milyon kişi de bu enfeksiyon nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Günümüzde tüberkülozdan korunmak için kullanılan aşı BCG aşısıdır. Ancak hastalığa karşı kısmi koruma sağlamakta ve bilhassa yüksek endemik bölgelerde tüberküloz'u kontrol altına almakta yeterli olamayabilmektedir.

Tüberküloz insidansının yüksek olduğu muhtaç ülkelerde tedavi edilememekte ve çoğu olgularda da tüberküloz ilaçları yetersiz kalmaktadır. Çoklu ilaç direnci hastalığın kontrolunda büyük problemler yaratmaktadır. 30 yıldan daha uzun bir süredir tedavide birincil ilaç tedavisine yeni ilaçlar eklenememiştir. Ayrıca, son yıllarda HIV enfeksiyonuna bağlı duyarlılık artması ve kullanılan esas antibiyotiklere dirençli suşların artması dikkatleri tüberkülozdan korunmaya çekmiştir. Ayrıca HIV epidemisine bağlı olarak durum daha ciddiyet kazanmıştır. M.tb ile HIV arasında belirgin bir sinerji mevcuttur. Aktif tüberküloz HIV'e bağlı immün yetmezliği ve mortaliteyi 2 misli arttırmaktadır. Afrika'da HIV'le enfekte kişilerde ölümlerin %32'sinden sorumludur.

Bütün bu nedenlerden dolayı acil olarak bir aşıya ihtiyaç vardır. BCG aşılanmasının büyük farklılıklar göstermesi ve bazı ülkelerde koruyuculuğunun çok düşük olarak bildirilmesi muhtemelen kullanılan değişik suşlara, çevre faktörlerine ve konağın genetik faktörlerine bağlı olabilir. Enfeksiyonun akut fazı hızlı bakteri üremesi ve salgılanan bakteriyel antijenlere karşı immün yanıt gelişmesiyle karakterizedir. Makrofajlar ve lenfositler enfeksiyon bölgesine göç ederek granülom oluşumunda rol oynarlar. Enfeksiyon çoğu olguda immün sistemin kontrolu altındadır. Granülomda Th1 lenfositleri tarafından sitokin yapımı da önemli bir faktördür. Ancak bakteri elimine edilemez ve granülom ortamına uyarak dormant faz denilen metabolizmanın ileri derecede yavaşladığı ve gen ekspresyonunun belirgin bir şekilde değiştiği döneme girer. Sonuçta klinik

belirtilerin olmadığı ve 10 yıllarca bile sürebilen bir latent döneme girilir.

Denge herhangi bir zamanda değişebilir, örneğin immünsupresif bir olayla fazla bakteriyel replikasyon ve tüberkülozun klinik reaktivasyonu gerçekleşebilir. Tüberküloz enfeksiyonunun değişik dönemlerinde bakterinin fenotipinde de değişiklikler oluştuğu göz önüne alındığında başarılı bir aşının antijen tanıma açısından geniş spektrumlu olması gerekliliği doğmaktadır.

BCG Aşısı:

1921'den bugüne kadar 3 milyardan fazla kişi BCG ile aşılanmıştır. BCG ucuz ve emniyetli bir aşı olup çocukları tüberkülozun erken manifestasyonlarına karşı korur. Ancak erişkin pulmoner tüberküloza karşı sınırlı etkili olup, çeşitli çalışmalarda koruyuculuğunun %0-80 arasında değiştiği bildirilmiştir. Tartışma konusu olmakta devam etmesine karşın çoğu çalışma sonuçları BCG'nin koruyuculuğunun 10-20 yıl arasında değiştiğini göstermektedir. BCG'nin koruyuculuğu zamanla azaldıkça genç erişkinlerde enfeksiyon görülme insidansı armaktadır. Yine son çalışmalarda BCG'nin canlı aşı olarak çevresel mikobakterilerle karşılaşarak desensitize olanlar ve önceden BCG aşısı yapılanlarda etkili olmadığı gösterilmiştir.

BCG koruyucu immünite geliştirmek için bakteriyel replikasyona ihtiyaç duyar, bakteri replikasyonu ise önceden var olan ve BCG ile çapraz reaksiyon veren immün yanıtla bloke olur, dolayısıyla koruyucu immün yanıt gelişmesi sınırlanmış olur. Sensitize erişkinlerde BCG'nin başarılı olamaması, doğumda aşılananların zamanla BCG'nin azalan etkisini artırmak için booster aşılamada başarılı olamadığını da göstermiştir.

Halen kullanılan aşı DSÖ tarafından yüksek prevalans ve insidans olan ülkelere tavsiye edilmektedir. BCG halen altmıştan fazla ülke tarafından zorunlu aşı programında olup, 160 dan fazla ülke tarafından da uygulanmaktadır. Dünyada en yaygın kullanılan aşı durumundadır. Bir çalışmada tek doz BCG'nin hayat boyu koruma sağlayabileceği ileri sürülmüştür. HIV'le enfekte çocuklarda BCG aşı komplikasyonları oldukça nadirdir. Çocukluğunda BCG olmuş erişkin AIDS'lilerde dissemine tüberküloz riski de düşüktür. Ayrıca çocukluk aşılaması ileri dönem AIDS'lilerde M.tb bakteremisine karşı da koruyucudur.

Uygulanan aşılar arasında etki farkı bulunmaktadır. Bu farklılıklar da değişik nedenlere bağlanmaktadır. ör: genetik farklılıklar. Ayrıca çevresel mikobakterilerle karşılaşmada bilhassa tropikal ülkelerde BCG'nin etkisini maskelemekte veya önlemektedir.

BCG'de GENETİK FARKLILIKLAR

Kullanımdaki BCG patojen bir M. bovis klinik izolatının 1908-1921 yılları arasında patates-gliserin-ox safralı besiyerinde 230 seri pasajı sonucunda elde edilmiştir. Etkinlik farklılıkları BCG suşları arasındaki farklılıklara bağlanmaktadır. Yıllar süren pasajlar sonucunda farklı BCG aşı suşları oluşmuş ve hem orijinal BCG'den hem de birbirlerinden farklılıklar göstermiştir.

1921'den bu yana 1961'de DSÖ BCG kültürlerinin liyofilize edilip -80^0C'de saklanmasını tavsiye edene kadar BCG aşı suşu çok değişik laboratuvarlarda üretilmiştir. Sonuçta çeşitli varyantlar oluşmuştur. Bunların arasında BCG Pasteur, BCG Moscow ve BCG Brazil bulunmaktadır. Bu farklı suşlar birbirlerinden ve atalarından farklıdırlar. Dolayısıyla BCG aşıları koruma ve etki farklılıklarından dolayı çoğul olarak anılmaktadır.

BCG aşıları 2 büyük gruba ayrılmaktadır:

BCG Tokyo, Moreau, Rusya ve İsveç fazla miktarda MPB70 salgılamakta, iki kopya IS6110 içermekte ve methoxymycolate ve MPB64 genlerini içermektedir.

BCG Pasteur, Kopenhag, Glaxo ve Tice ise aksine az miktarda MPB70 salgılamakta tek kopya IS6110 içermekte ve methoxymycolate ve MPB64 genlerini içermemektedir.

Genomik çalışmalar ile 1921-1961 yılları arasında BCG suşlarında delesyonlar ve duplikasyonlar ve IS6110 kopya sayılarında değişiklikler olduğu belirlenmiştir. BCG suşlarındaki bu karmaşık yeni yapılanmalar fenotipik ve immünolojik farklılıklara ve aşı etkinliğinde değişkenliğe yol açmıştır. Bunların sonucunda solunum sistemi formlarına kullanılan aşılardan tüberkülozu daha etkili bir şekilde eradike edebilecek aşı ihtiyacı oluşmuştur. Yeni oluşturulacak canlı aşılarda alt suş farklılıkları ve koruma etkinliğindeki farklılıkların üstesinden gelinmeli ve attenüasyon faktörleri bilinmelidir. Bir diğer önemli konu ise dünyada çok fazla sayıda BCG aşısı olmuş kişilerin de bu yeni aşı ile korunmasının gerektiğidir. Tabii yeni aşıların HIV'le enfekte kişilerde de emniyetle kullanılması gerekmektedir.

YENİ AŞILAR

1) Alt ünite aşıları (Cansız)

2) Canlı aşılar

1) Alt ünite aşıları:

İmmünodominant mikobakteriyel antijenlerden hazırlanmıştır. M.tb tarafından salgılanan proteinleri kullanan alt ünite aşılarıdır. Burada temel; yaşayan bakteriler tarafından salgılanan proteinlerin enfekte makrofajlar tarafından erken immün tanınması ve bakteri çoğalmasının kontrol edilmesidir.

Ag85A ve Ag85B de M.tb tarafından salgılanan major komponentlerden olup, M.tb'ye karşı insan T-hücre yanıtının önemli hedeflerinden olan aşı adaylarıdırlar. Ag85B deney hayvanlarında koruyucu bağışıklık yanıtına neden olmuştur. Ag85A ve ESAT-6'dan oluşan füzyon proteininin farelerde ve insan harici primatlarda çok koruyucu olan kuvvetli bir immün yanıta yol açtığı gösterilmiştir. Füzyon molekülü içeren BCG'nin parental BCG suşuna göre belirgin bir şekilde daha koruyucu olduğu gösterilmiştir.

Potansiyel tüberküloz alt ünite aşıları farelerde M.tb'ye karşı bir dereceye kadar koruyucu olan ESAT-6 gibi immünodominant tüberküloz antijenleri kullanılarak elde edilmişlerdir. ESAT-6 ve ag 85B deki protein füzyonları kuvvetli bir adjuvanla birlikte farelere verildiğinde füzyon proteinlerine karşı doza bağımlı immün yanıt oluşturmaktadırlar. Bu immün yanıt BCG ile indükte koruyucu immün yanıtla mukayese edilebilir bir koruyucu yanıta eşlik etmektedir.

Hayvan deneylerinde Ag85B-ESAT-6 füzyon içeren alt ünite tüberküloz aşılarının çevresel mikobakterilerle önceden sensitize edilmeyle etkinliğinin etkilenmediği gözlenmiştir.

Ag85B-ESAT-6 füzyonu DNA aşısı olarak BCG ile ilk ve tekrar aşılamalarda kullanıldığında aktivitesinin çok iyi olduğu gözlenmiştir. Füzyon molekülünün tek komponentlere göre daha üstün aktivitesi olduğu bildirilmiştir.

M.tb'nin anahtar antijenleri alt ünite aşıların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Ör: M.tb72F 72-kDa poliproteini (M.tb32©-M.tb39-M.tb32(N) kodlamaktadır. Farelerin AS01B adjuvanında hazırlanmış M.tbe72F proteini ile immünizasyonu sonucunda güçlü bir immün yanıt oluşur. Sonuçta poliprotein aşının her üç komponentine karşı kuvvetli antikor ve IFN- yanıtları ve M.tb32©

epitopuna kuvvetli bir CD(8) yanıtı oluşur. M.tb72F C57BL/6 farelerde aerosol yoldan virülan M.tb'ye karşı koruyucudur.

TB10.4 (RV0288) adı verilen bir diğer protein tüberküloz hastaları tarafından ESAT-6 kadar iyi tanınmakta ve BCG'de bulunmayan ESAT-6'nın aksine BCG aşılılar tarafından da tanınmaktadır. Bazı çalışmaların sonuçları enfeksiyonun farklı dönemlerinde gen ekspresyonunun radikal bir değişikliğe uğradığını ve belirli bir genin eksprese edilmesinin latent dönem için karakteristik olabileceğini akla getirmiştir(9). Bilhassa latent dönemde özgül olarak beliren genlerin buna bağlı olarak da antijenlerin saptanmasının ve alt ünite aşılarına komplementer antijen olarak ilave edilmesinin aşı çalışmalarına yön vereceği düşünülmektedir (ör: Rv2031c5).

BCG'yi alt ünite aşıları ile desteklemek suretiyle çocukluktaki BCG aşısının etkinliğini artırmak ve immün sistemi sonraki tekrar aşıya hazırlayarak erişkin manifestasyonlarından korumak için bir yol olabilir. Bu işlem 10-12 yaş grubunu alt ünite aşılarıyla aşılayarak yapılabilir.

Dünyada 2 milyar kadar kişinin latent olarak enfekte olduğu düşünülürse bakterinin latent fazdaki antijenlerini de tekrar BCG aşısına dahil etmek mantıklı bir yaklaşım olacaktır.

Alt ünite aşılarının BCG'ye göre en büyük avantajı çevresel mikobakteri veya BCG ile sensitize edilenlerde gösterdikleri aktivitedir.

2) Canlı aşılar:

Bunlar genetik manipülasyonlar sonucu immünodominant antijen salgılayabilen veya yapabilen BCG suşları veya random mutagenez ile elde edilmiş ve virulans genleri delesyona uğratılmış attenüe M.tb suşlarıdır.

BCG'nin etkinliğini arttırmak için bir yaklaşım alt ünite aşı olarak koruyuculuğu sağlayan M.tb proteinlerini kodlayan genleri BCG'ye ilave etmektir. RD1 lokusu M. tb'nin virülansı ile ilgili olup BCG'de bulunmaz. Bu lokus M.tb enfeksiyonunda immün hedef olan ESAT-6, CFP-10 ile ilgili genleri içerir.

Ag85B proteinini eksprese eden ve sekrete eden rekombinant BCG (rBCG30) kobaylarda artmış koruma sağladığı gösterilmiştir.

Bir diğer rekombinant BCG farelerde korunmayı arttıran DureC hly+ rBCG' dir. Bu aşı adayı ureazdan yoksun bir BCG mutantı olup, *L. monocytogenes*'in listeriolisin O genini eksprese etmektedir. Listeriolizin potansiyel olarak bakteriyal orijinli antijenleri CD+8 hücrelere MHC-I aracılı sunumunu fagozomal içeriğini sitozole sızdırarak indükler.

Bütün yeni aşılarda istenen, arzu edilen BCG'den daha kuvvetli belki de daha uzun süren immün yanıtlardır. Ancak alt ünite aşılarının aksine BCG temelli aşılar muhtemelen neonatlarda kullanılacaktır. Latent enfeksiyonu olan erişkinlerde ve çevresel mikobakterilerle sensitize olmuş kişilerde pek aktif olması pek beklenmemektedir. Ayrıca canlı, attenüe aşıların baskılanmış immün sistemi olan kişilerde emniyet sorunu olabilme şansızlığı da muhtemeldir.

Sonuç olarak BCG veya rBCG aşısının etkisini arttıran bir aşı belki de en gerçekçi yaklaşım olabilir. Hazırlanacak rBCG tb hastalığının değişik dönemlerindeki önemli antijenleri içermeli ve $CD4^+$ and $CD8^+$ T hücreleri aracılığı ile bağışıklık sağlamalıdır. Tekrar aşılarda da adjuvanlar veya çoğalmayan viral veya kapsid vektörler ile uygulanan rekombinant proteinler kullanıldığında iyi sonuçlar alınacağı ümit edilmektedir. Latensi ve reaktivasyona karşı aşıların da geliştirilmesinde dosR antijenleri kullanılması söz konusu olmaktadır.

Tablo 1.Geliştirilmekte olan yeni TB aşıları

Tip	Aşı adı	Yapısı	Klinik Faz
1. jenerasyon aşılar	MVA85A	Vaccinia-vektörlü Ag85A	Faz I (2003); Faz II (2007
	rBCG30	BCG Tice plasmid aracılığı ile Ag85B'nin fazla yapımı	Faz 1 (2004)
	Mtb72F	Rekombinant füzyon proteini	Faz 1 (2004)
	Hybrid-1	Ag85B ve esat-6 ag.lerinden oluşmuş Füzyon proteini	Faz 1 (2005)
	Advac	Adenovirus'un vektör olduğu 85B	Faz 1 (2006)
Diğer aday aşılar	HyVac-4	85B and 10.4 ag.lerinin füzyon proteini	Faz 1 (2007)
	rBCG_UreCHly	BCG Pasteur'e Listeriolysin ilavesi	Faz 1(2007)
	rBCG-AERAS-403	Endosomdan kaçış ve fazla ag.ifadesi	Faz I (2007)
	BCG::RD1	RD-1 lokusu eklenmiş BCG Pasteur	Preklinik çalışmalar
	M. tuberculosis PhoP A	Virülans geni *PhoP*, çıkarılmış M. *tuberculosis*	Preklinik çalışma
	AERAS X05	TB ag. kodlayan*Shigella* RNA kapsidleri	Preklinik çalışma

KAYNAKLAR

1- Dietrich J, Vingsbo Lundberg C, Andersen P. TB vaccine strategies-What is needed to solve a complex problem? Tuberculosis (2006) 86, 163-168.
2- Martín C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? Eur Respir J 2005; 26:162-167.
3- Girard MP, Fruth U, Kieny MP. A iew of vaccine research and development: Tuberculosis. Vaccine Volume 23, Issue 50 , 30 December 2005, Pages 5725-5731
4- Sven Baumann, Ali Nasser Eddine and Stefan HE Kaufmann. Progress in tuberculosis vaccine development. Current Opinion in Immunology 18,(4):438-448, 2006.
5- Yasir A. W. Skeiky1 and Jerald C. Sadoff1 Science and society: Advances in tuberculosis vaccine strategies. Nature Reviews Microbiology 4, 469-476, 2006.
6- Michael J Brennan,* Uli Fruth, Julie Milstien, Rosemary Tiernan, Sergio de Andrade Nishioka, Liliana Chocarro, Development of New Tuberculosis Vaccines: A Global Perspective on Regulatory Issues PLoS Med. 2007 August; 4(8): e252
7- W. Henry Boom New TB vaccines: is there a requirement for CD8+ T cells? J Clin Invest. 2007 August 1; 117(8): 2092-2094.

TÜBERKÜLOZ VE GELECEK

Uz. Dr. Feyzullah GÜMÜŞLÜ
Verem Savaş Dairesi Başkanı, Ankara

Organize verem savaş faaliyetleri 1918 yılında gönüllü kuruluşların öncülüğünde başlatılmıştır. 1930'larda "Umumi Hıfzıssıhha Kanunu" ile devletin politik kararlığını ortaya konulmuş ve 1949 tarihli "Veremle Mücadele Kanunu" ile verem savaş hizmetlerinin yasal çerçevesi çizilmiştir.

1950'li yıllarda aşı kampanyaları odaklı sürdürülen verem savaş programı, 1960'larda Sağlık Bakanlığı içerisinde en üst seviyede "genel müdürlük" olarak örgütlenerek mücadelede ülke kaynakları mümkün olan en yüksek oranda seferber edilmiştir. Bu dönemde programın esasını aktif sürveyans metodu ile tarama ve aşılama oluşturmuştur.

2000'li yıllara kadar veremle savaş programı geleneksel olarak yürütülmüştür. 1991 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi(DGTS)'ni tüm dünyaya yegane metot olarak önermesini takiben biraz gecikmeli de olsa Türkiye'de de bu metot uygulanmaya başlanmıştır.

2006 yılı itibari ile Türkiye'de %100 kapsama alanıyla uygulamaya konulan DGTS ile paralel, aşılama programları ikinci plana çekilerek vaka bulma ve bulunanları doğrudan gözetim altında tedavi etme, programın temelini oluşturmuştur. Bunun sonucunda 2005 ve 2006 yıllarında kayıt altına alınan hasta sayısında belli oranlarda artış sağlanmasının yanı sıra 2005 yılı kohortunda %85'lik tedavi başarısı hedefine ulaşılmıştır.

Laboratuvar ağında tamamlanması gereken metodolojik standardizasyon ve kalite kontrol programlarının işletilmeye başlaması ve laboratuvarların 2008 yılında alt yapı-ekipman ve ağ işleyişi ile ilgili düzenleme ve düzeltmelerin yapılması ile;

1- Önümüzdeki birkaç yıl içinde vaka bulmada gittikçe azalan bir artış,
2- Takip eden yıllarda, 2050'li yıllarda veremin sporadik olarak görülen hastalık haline getirecek bir verem savaş programı hedeflenmektedir.

Bilinmelidir ki tüberküloz, epidemiyolojik karakterinin bir fonksiyonu olarak 3-5 yıllık program ve hedeflerle eradikasyon çizgisine getirilecek bir hastalık değildir.

UYGULAMALI KURS KONULARI

TÜBERKÜLOZ LABORATUVARINDA ÇALIŞMA PRENSİPLERİ

Dünya sağlık teşkilatı (WHO)'nın kararına göre bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konabilmesi için uygun şekilde alınan klinik örneğin laboratuvara gönderilmesi, ekim yapılan besiyerlerinde üretilmesi ve tanımlanması gerekir. Bu amaçla laboratuvarda görevlendirilecek personel ve çevrenin güvenliği için aşağıdaki hususlara riayet edilmesi gereklidir.

Bunlar;

1. Personelin PPD deri testi bilinmeli, negatif ise BCG aşısı yapılmalıdır. Yılda bir toraks grafisi çekilmeli ve fizik muayenesi yapılmalıdır.
2. Personel tüberküloz hakkında bilgilendirilmeli ve laboratuvar kazalarında yapacağı işlemleri bilmelidir.
3. Canlı tüberküloz basili ile ilgili tüm işlemler Class II mikrobiyolojik emniyet kabininde yapılmalıdır.
4. Emniyet kabini açıldıktan 15 dakika sonra çalışmaya başlanmalıdır.
5. Personel koruyucu ekipmanlarla donanımlı olarak çalışmalıdır.
   a. Sadece çalışma alanında kullanabileceği koruyucu önlük giymelidir.
   b. Mutlaka eldiven kullanmalıdır.
   c. Hepa filtreli (N95 standartlarında) maske takarak çalışılmalıdır.
   d. Olası sıçramalardan korunmak amacı ile gözlük veya yüz sperliği kullanılmalıdır.
6. Çalışma alanı gerektiğinde ve işlemler tamamlandığında 10-50 kat sulandırılmış TSE belgeye sahip sodyum hipoklorid solusyonu ile silinmelidir.
7. Ayrıca işlem sonrasında ortam ultraviyole ışığı ile dezenfekte edilmelidir.
8. Tüberküloz Laboratuvarının enfekte atıkları otoklavlanarak atılmalıdır.
9. Klinik materyal vortekslendikten sonra 15 dakika durağan bırakılmalıdır.
10. Çalışma alanına ancak görevli personel girmeli, personel çıkarken mutlaka önlüğünü laboratuvarda bırakmalıdır.
11. Çalışma esnasında odanın kapısı kapalı olmalıdır (Negatif basınçlı odalar önerilir)
12. M. tuberculosis complex için aşağıdaki durumlarda zaman geçirilmeden klinisyene bilgi verilmelidir.
    a. Direkt mikroskopide AARB görülmesinde,
    b. Direkt materyalden moleküler yöntemlerle M. tuberculosis complex'i tanımlandığında,

c. Kültürden üreyen tüberküloz basilinin moleküler veya klasik yöntemlerle tanısı konulduğunda,
d. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi durumunda

13. Tüberküloz ile ilgili materyal, üzerinde tehlikeli biyolojik materyal işareti bulunan iç-içe geçmiş üç kap sistemi ile gönderilmelidir.

KLİNİK ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI VE KÜLTÜRÜ

Prof.Dr. Meltem UZUN
İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İnfeksiyon hastalıklarının tanısının doğru yapılabilmesi için uygulanan yöntemlerin duyarlığının yanısıra, incelenecek klinik örneklerin alınmasında ve laboratuvara gönderilmesinde belirli kurallara uyulması gerekmektedir.Tüberküloz tanısı için de klinik örneklerin alınma, laboratuvara gönderilme ve işlenmesinde belirli kurallar vardır.

Örnek alınması ve laboratuvara ulaştırılması ile ilgili genel kurallar:

- Örnekler temiz, steril, sızdırmaz, burgulu kapaklı, dayanıklı ve tek kullanımlık kaplar içine yeterli miktarda alınmalıdır. Örnek enjektöre alınacak ve enjektörle gönderilecekse luer tipi kapaklı enjektörler kullanılmalıdır.
- Kabın üzerine örneğin kimden, ne zaman alındığı ve örnek tipi yazılmalı, ayrıca istek kağıdında (veya otomasyon programı olan kurumlarda elektronik ortamda) hasta ve örnek ile ilgili gerekli bilgiler belirtilmelidir.
- İlk örnekler antimikrobiyal tedavi başlamadan önce alınmalıdır.
- Endojen flora ve çevresel kontaminasyonu en aza indirmek için örnekler olabildiğince aseptik şartlarda alınmalıdır.
- Üremeyi engelleyici herhangi bir koruyucu kimyasal maddeler kullanılmamalıdır.
- Kontaminant bakteri ve mantarların üremesinden kaçınmak için alınan örnekler olası en kısa zamanda laboratuvara gönderilmeli ve işlenmelidir. Bu süre bir saati aşacaksa örnek 2-8 °C'de bekletilmelidir (kan hariç).

Kabul edilmemesi gereken örnekler:

- Sürüntü örnekleri;

(Ancak başka bir şekilde örnek alınamıyorsa, kurumaya engel olmak için sürüntü örnekleri bir transport besiyerine konularak gönderilen örnekler kabul edilebilir)

- Uygun olmayan kapta gelen örnekler;
- 24 saatlik, biriktirilmiş örnekler;
- Dondurulmuş örneklerdeki canlı basil oranı azaldığından

Kabul edilmeyen örnekler için yapılacak işlemler:

- Hemen ilgili doktor telefonla aranır, örneğin kabul edilemez olduğu ve nedeni

açıklanır.

- Örnek ile ilgili bilgilere ek olarak, örneğin işlenmeme nedeni, telefonla bilgilendirilen kişinin adı ve görüşme zamanı not edilir.

İşlenmeyen örnekler 2-8°C 'de 3 gün bekletilir. Tekrar örnek alınamaması durumlarında mevcut örnek değerlendirilir.

I. Pulmoner Örnekler :

Ekspektore veya indüklenmiş balgam, açlık mide suyu, bronkoalveoler lavaj, transtrakeal aspirasyon, bronşial fırçalama ve laringeal sürüntü örnekleri pulmoner örneklerdir .

Balgam:

- Birbirini izleyen üç ayrı günde 5-10 ml(miktarı alındığı kabın 1/5 ini geçmemelidir;örn; 50 ml'lik kaplara en fazla 10 ml) sabah balgamı alınması tercih edilir. Ardı ardına 5-6 günden fazla örnek alınması gereksizdir.
- Tedavi takibinde, tedavinin başlamasından 3 hafta sonra ilk kez olmak üzere, birer hafta aralıklarla balgam örnekleri alınmalıdır.
- Alınan balgam örneği derin, prodüktif bir öksürükle akciğerlerden gelen koyu, eksüdatif örnek olmalıdır.
- Yiyecek artıkları ve ağız florası ile balgamın kontamine olmasını engellemek için balgam çıkarmadan önce hasta ağzını suyla çalkalamalıdır.
- Hastaya uygun balgamı nasıl vereceği, tükürüğün ve nasofaringeal sekresyonların balgam olmadığı anlatılmalıdır.
- Balgam özel bir odada veya açık havada çıkartılmalı, bu mümkün değilse gerekli korunma önlemleri alınmalıdır.

İndüklenmiş balgam:

Hasta balgam çıkaramazsa indüklenmiş balgam örneği alınabilir. Balgam indüksiyonu;

- Steril, ılık, aerosolize hipertonik tuzlu su (%10 NaCl) inhalasyonu ile yapılır.
- Bu solüsyon hastaya nebulizatör yardımı ile 10 dakika kadar derin ve yavaş solutulur, sonra derin ve kuvvetli bir öksürük ile balgam alınır.
- Örnek en az 10 ml olmalıdır.

İndüklenmiş balgam suludur ve tükürüğe benzer bu nedenle reddedilme riskine karşı indüklenmiş balgam olduğu istek kağıdında belirtilmelidir.

- Musluk suyundaki saprofit mikobakteriler yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceğinden nebulizatör suyu ile balgamın kontaminasyonundan kaçınılmalıdır.

Bronkoalveoler lavaj (BAL):

- Steril kaplara en az 5 ml. örnek alınmalıdır.
- Kullanılan bronkoskobun musluk suyu ile kontaminasyonundan kaçınılmalıdır.
- Kontamine bronkoskop ile bulaş olabileceğinden bronkoskopun fiziksel temizliği ve yüksek düzey dezenfeksiyonu önemlidir.

Bronşiyal fırçalama:

Bronşiyal fırçalama ile elde edilen örnek Middelebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren steril kaplara konulmalıdır.

Transtrakeal aspirat:

Çok sık gelen bir örnek değildir. Bazı olgularda yararlı olabilir. Enjektörle veya steril kaplara, olabildiğince fazla miktarda alınmalıdır.

Açlık mide suyu (gastrik lavaj sıvısı):

Tüberküloz tanısı için uygun bir örnek değildir ancak; tüberküloz olduğu radyolojik olarak kanıtlanmış balgamı negatif kalan hastalarda,balgam çıkaramayan ya da balgamını yutan hastalarda,nörolojik hastalıklar veya koma hali nedeniyle öksüremeyen hastalarda veya balgam alımının zor olduğu bebek/küçük çocuklarda başka yöntemlerle pulmoner örnek alınamıyorsa tercih edilebilir. Bu sıvı;

- En az 5-10 ml. olmalı ve birbirini takip eden üç gün boyunca, sabah erken aç karnına alınmalıdır.
- Örnek alımı hasta uyandıktan hemen sonra, tercihen yatağından kalkmadan önce yapılmalıdır.
- Örnek dört saat içinde işlenemeyecekse 100 mg sodyum karbonat bulunan steril kaplara alınarak laboratuvara gönderilerilmelidir.

Larenks sürüntüsü:

Sürüntü örneği, 1 ml kadar serum fizyolojik veya tampon çözeltisi içeren bir kap içinde gönderilmelidir.

II. Ekstrapulmoner Örnekler:

Laboratuvara en sık gönderilen ekstrapulmoner örnekler idrar, steril vücut sıvıları ve dokulardır. Nadir olarak kan ve dışkı örnekleri de gelebilir.

İdrar:

- Birbirini izleyen 3-5 gün süre ile en az 40 ml. olacak şekilde orta akım sabah ilk idrarı alınır.
- İdrar verilmeden önce dış üro-genital bölgenin temizlenmesi kontaminasyon riskini azaltır.
- Orta akım idrar alınamıyorsa kateter ile idrar alınabilir.
- 24 saatlik biriktirilmiş veya kateter torbasından alınan idrar kabul edilmemelidir.

Steril Vücut Sıvıları (plevral, perikardiyal, peritoneal sıvılar ve beyin omurilik sıvısı):

- Miktarı mümkün olduğunca fazla olmalı(mümkünse 50 ml) ve 10-15 mililitreden az olmamalıdır (BOS için en az 2 ml). Miktar daha az ise direkt olarak Bactec 13A şişesine veya diğer bir sıvı besiyerine (Middlebrook 7H9, Dubos tween albümin) ekilebilir.
- Bu sıvıların çoğu fibrinojen içerebileceğinden toplama kabına antikoagülan olarak sodyum poliyanetol sülfonat (SPS) veya heparin eklemek gerekebilir.

Abse örnekleri ve Aspirasyon sıvıları:

Örnek alımından önce alkol ile cilt temizliği yapılarak, mümkün olduğunca çok miktarda örnek enjektör ile aspire edilmelidir. Küçük miktarlardaki aspirasyon sıvılarının taşınması için Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri kullanılabilir. Aspirasyon için hacim yeterli olmadığı durumlarda sürüntü alınabilir. Sürüntü örneklerinden elde edilen negatif sonuçların güvenilir olmadığı rapor edilmelidir.

Doku örnekleri (lenf nodu, deri ve diğer biyopsi örnekleri):

- En az 1 gram doku parçası, mümkünse aseptik şartlarda steril kaplar içine alınmalıdır.Çok küçük miktarda biopsi örneği alınmışsa mutlaka serum fizyolojik içine koyulmalıdır. Alınan örnek gazlı beze sarılmamalıdır.
- Lezyonun kazeöz kısımı seçilmeli ve deri ülserlerinde lezyonun periferinden biyopsi alınmalıdır.
- Formalin içinde gönderilen örnekler kabul edilmemelidir.

Kan:

- Aseptik koşullarda alınan kan örneği direkt olarak hasta başında 10 ml'lik isolatör tüpe veya Bactec 13A şişesine ve bu amaçla kullanılan diğer kan kültür şişelerine 5 ml.olacak şekilde aktarılır.
- Hasta başında ekim yapılamadığı durumlarda 10 ml kan SPS veya heparin içeren steril tüplere alınır.
- EDTA (etilendiamintetraasetik asit)'lı tüplere toplanan kanlar ve koagüle kanlar kabul edilmez.

Dışkı:

- En az 1 gr dışkı örneği steril, tek kullanımlık, parafin içermeyen bir kap içine alınır.
- AİDS hastalarının dışkılarından Mycobacterium avium complex (MAC) sıklıkla üretilebilir.Ancak bu hastalar için rutin inceleme önerilmez.

Örneklerin Gönderilmesi:

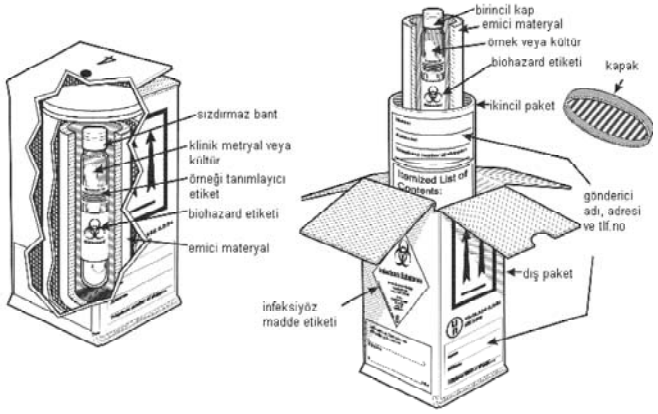
Dünya sağlık örgütü (DSÖ), CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ve uluslararası yasal düzenlemeler klinik örneklerin ve mikobakteri kültürlerinin postalanmasında üçlü kap sistemini zorunlu kılmaktadır.Mikobakteri kültürlerinin postalanmasında burgulu kapaklı tüplerdeki katı besiyerine pasaj yapılmalı, petri kutusu veya sıvı besiyeri kullanılmamalıdır. (Resim 1)

Birincil kap (primer kap): materyalin konduğu, cam veya plastikten yapılmış burgulu kapaklı,sızdırmaz, şok ve basınç değişikliklerine dirençli kaplardır. Kapaklar ayrıca bir bant veya benzer materyal ile sarılabilir. Örneği tanımlayıcı bilgi veya numara kabın üzerine yazılmalıdır.

İkincil kap (sekonder kap): Bir veya daha fazla birincil kabın konulduğu sızdırmaz, dayanıklı bir kaptır. İkincil kap ile birincil kap arasındaki boşluğa (alt, üst ve yanlar) herhangi bir sızma durumunda tüm içeriği emebilecek ve birincil kapların birbiriyle temasını engelleyecek kuvvetli bir emici madde (bez, pamuk) yerleştirilmelidir. İkincil kap üzerine göndericinin adı, adresi ve telefon numarası yazılmalıdır.

Dış kap (postalama kabı): İkincil kabın konulduğu, dayanıklı, sert bir malzemeden yapılmış (tahta, oluklu mukavva, sert plastik, vs.) kaptır. Kabın içine ikincil kap ile beraber içeriğin ayrıntılı listesi de konulmalıdır. Kuru buz

kullanılacaksa bunlar ikincil kap ile dış kap arasına konulmalı ve kuru buz buharlaştığında ikincil kabın orijinal pozisyonu bozulmayacak şekilde desteklenmeli, buz kullanılacaksa su sızdırmaz şekilde olmalıdır. Dış kap üzerine gönderici ve alıcının adı, adresi, telefon numarası yazılmalı, enfeksiyöz (bulaşıcı) madde yazısı ve biyolojik tehlike (biohazard) etiketi yapıştırılmalıdır.



Resim 1: İnfeksiyöz maddelerin paketlenmesi ve etiketlenmesi (CDC'den)

ÖRNEKLERİN İŞLEMLENMESİ VE KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyonu için klinik örneklere lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntılardan arındırmak amacı ile homojenizasyon/dekontaminasyon ve örnekteki bakteri yoğunluğunu artırmak için konsantrasyon işlemi uygulanır.

Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işleminde en sık N-Asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) ve NaOH (%3-4) gibi yöntemler kullanılmakla birlikte; zefiran-trisodyum fosfat, oksalik asit, setilpridinyum klorid-sodyum klorid gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabilir.

N-Asetil-L-Sistein(NALC)+Sodyum hidroksit(NaOH) yöntemi

NALC mukolitik, NaOH dekontaminan ve sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır.

NALC-NaOH solusyonunun hazırlanması:

% 4 NaOH	+	% 2.9 Sodyum sitrat	+	NALC
50 ml		50 ml		0.5 gr

NALC oksijene duyarlı olduğu için bu karışım hazırlandıktan sonra 24 saat içinde kullanılmalıdır. NALC' ın tartım işlemleri sırasında ambalajın ağzı uzun süre açık bırakılmamalıdır.

Yöntem:

- Klinik örnek 50 ml'lik polipropilen, dibi konik, burgulu kapaklı steril tüplere (Falkon tüpü) aktarılır ve üzerine klinik örneğin miktarı kadar NALC-NaOH solüsyonu ilave edilir. Örnek 10 ml'den fazla ise en pürülan, mukoid ve kanlı kısmından 10 ml alınmalıdır. Mukoid olmayan örnekler santrifüjde çevrildikten sonra elde edilen sediment dekontamine edilir.
- Örnek + NALC-NaOH karışımını içeren tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslenir. Tüpler oda ısısında ara sıra elle çalkanarak 15 dakika bekletilir. Bu süre aşılmamalıdır.
- Dekontaminasyon işlemini takiben yapılacak her işlemde asepsi-antisepsi kurallarına uyulmalıdır.
- Süre tamamlandığında nötralizasyon amacı ile Falkon tüpünün 50 ml – işaretine kadar 0,067 M fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edilip, karışım el yardımı ile alt-üst edilir ve dekontaminasyon işlemi durdurulur.
- Fosfat tamponu ilave edilmiş tüpler, bakteri yoğunluğunu artırmak için 3000 x g'de 15-20 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant, içinde 1/10-1/50 dilüe edilmiş sodyum hipoklorid bulunan bir kaba boşaltılır.
- Sedimente 1-2 ml steril fosfat tamponu (pH 6.8) veya % 0.2'lik sığır albumin fraksiyon V ilave edilir.
- Resüspanse işlemi uygulanır ve kullanılan kültür yöntemine uygun olarak besiyerine ekilir.
- Ayrıca direkt mikroskopik inceleme için lam üzerine yayma işlemi yapılır.

Normalde steril olduğu düşünülen BOS, vücut sıvıları ve kan gibi örneklere

dekontaminasyon işlemi uygulanmaz. Bu örnekler santrifüj edildikten sonra besiyerlerine ekimleri yapılır. Ancak örnek alımı ve transportu esnasında asepsi-antisepsi kurallarına uyulmamış ise bu örneklere de dekontaminasyon işlemi uygulanır.

KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

M.tuberculosis complex, uygun sıvı ve katı besiyerlerinde 35-37OC'de, 7-21 günde ürerler. Kültürler 8 haftaya kadar üretmemişlerse negatif sonuç verilir. Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan konvansiyonel besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. Katı özellikteki besiyerleri, yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelenir. Özellikle primer izolasyonda Löwenstein-Jensen (L-J) besiyerinin kullanımı yaygındır. Petragnani ve American Thoracic Society diğer yumurta bazlı besiyerleridir. Agar bazlı besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelendiğinde koloniler gözlenebilir. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar temelli besiyerleridir. L-J Gruft, Mycobactosel L-J, Mycobactosel Middlebrook 7H10, Mitchison's selektif 7H 11 antibiyotik ve antifungal içermeleri nedeniyle kontaminasyon daha az sıklıkta gözlenir. Eğer iki katı besiyeri kullanılacaksa besiyerlerinden birinin selektif olması önerilir.

KÜLTÜR İŞLEMİ

- Homojenizasyon- dekontaminasyon- konsantrasyon sonrası elde edilen sediment steril bir pipet yardımı ile alınarak 3 damla kadar L-J besiyerine ekilir ve besiyeri yüzeyine yayılması sağlanır. Ekim yapılan besiyerleri kapakları gevşetilerek 1-5 gün (biriken sıvı kaybolana kadar) yatık konumda bekletilir.
- Middlebrook 7H10 ve/veya 7H11gibi agar temelli besiyerleri kullanılıyorsa, 1 damla sediment besiyeri yüzeyine iyice yayılır ve her besiyeri CO2 geçiren plastik torbalara yerleştirilir.
- Hızlı kültür sistemlerine ekim firma önerileri doğrultusunda yapılır.
- M.marinum ve M.ulcerans ile infekte olduğu düşünülen deri ve yumuşak doku örneklerinden izolasyon için 30°C'de, M.haemophilum ile infekte olduğu düşünülen klinik örnekler özel besiyerine ekilir ve 35-37°C'de inkübe edilir.
- Ekim yapılan besiyerleri inkübasyondan 3-5 gün sonra ve takiben haftada bir kez kontrollerine devam edilir.

- Petrideki agar bazlı besiyerleri parafilm ile kapatılarak inkübe edilir ve ters çevrilerek mikroskop altında mikrokoloniler oluşumu ve morfolojik yapısı incelenir.
- Besiyerlerinde üreyen koloniler aside dirençli boyama yöntemlerinden biri ile incelenir.
- AARB pozitif olan izolatların tür tanısı yapılır.

Sıvı besiyerleri içinde yer alan Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılmasında, duyarlık deneylerive diğer in vitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla da kullanılır. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri genellikle hızlı kültür sistemlerinde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır. Primer izolasyon amacıyla katı besiyerine ilave olarak sıvı besiyerlerinin kullanılması önerilmektedir.

Özel besiyerlerine inokulasyon ve inkübasyon;
Hızlı kültür sistemleri içinde yer alan yarı otomatize Bactec 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks,MD) sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır rutin tanıda kullanılmaktadır. Radyometrik kültür tekniği ile mikobakteri üretici besiyerine değeri ölçülebilen substrat olarak radyoaktif karbon (14C) eklenir. Bu substrat mikobakteri tarafından utilize edilir ve metabolizma sırasında 14CO2 oluşur. BACTEC 460 ile radyoaktivite kantitatif olarak ölçülür. Antimikrobiyal olarak kullanılan PANTA (Polimiksim B-6000U/ml, Amfoterasin B-600g/ml, Nalidixik asit 2400g/ml, Trimetoprim laktat-600g/ml, Azlosilin 600g/ml) eklenir. Kontamine olmadığı düşünülen akciğer dışı örnekler bekletilmeden ekiliyorsa PANTA eklenmeyebilir.
Örnekler iğne ucu çıkmayan tüberkülin enjektörüyle PANTA eklIenmiş 12B besiyerine 0.1-0.5 ml ekilir. İnkübasyon; 37oC'de yapılır ve değerlendirme yoğunluğu fazla olmayan merkezlerde ilk 2-3 hafta haftada 3 defa yoğunluğu fazla merkezlerde ise ilk iki hafta iki sonra altı hafta boyunca haftada bir defa BACTEC 460 okuma cihazı ile yapılır. Üreme indeksi (GI) 10 altında ise negatif, 10 ise pozitif kabul edilir. İndeks 100'ün üzerine çıkınca ARB boyama yapılarak mikobakteri olup olmadığı doğrulanır.
MGIT (mycobacteria growt indicator tube); besiyeri olarak Middlebrook 7H9 broth kullanılır. OADC (oleic asid-albumin-dextroz-katalaz) ile zenginleştirilmiştir. Antimikrobiyal olarak PANTA kullanılır. İdrar ve kan hariç bütün örneklerin inkübasyonu için kullanılır. MGIT tüpleri de BACTEC'le aynı sıklıkta değerlendirilir.

UV ışığı ile hem tüp altında hem de sıvı besiyerinin üstünde çizgi şeklinde turuncu ışıklanma kontrol edilir. Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD Biosciences,Sparks,MD)inkübatörü ile tam otomize bir sistemdir. VersaTREK (ESP Culture System - Trek Diagnostics,Inc.,Westlake Ohio), MB/Bact T (bioMerieux, Hazelwood, Mo.), Bactec 9000 MB (BD Biosciences,Sparks,MD) mikobakterilerin tanısı için geliştirilmiş tam otomatize sistemlerdir. Ancak bunlardan Bactec 460 TB ve MGIT 960 için FDA onayı bulunmaktadır. Üreme süresi, oranı ve kontaminasyon sıklığı açısından tam otomatize sistemler arasında önemli bir fark bulunamamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Benjamin WH, Waites KB, Moser SA. The MB/Bac T is a sensitive method of isolating Mycobacterium tuberculosis from clinical specimens in a laboratory with a low rate of isolation. J Clin Microbiol 2000; 38: 3133-4.
2. Della-Latta P.,Weitzman I.Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press.1998: 169-75,175-83.
3. Della-Latta P. Digestion-decontamination procedures.In: Isenberg HD (ed).Clinical Microbiology Procedure Handbook.Vol 2, 2nd ed. Washington DC:ASM Pres.2004: 7.1.2.1
4. Lillian VL.Solid media for isolation. In: Isenberg HD (ed).Clinical Microbiology Procedure Handbook.Vol 2, 2nd ed. Washington DC:ASM Pres.2004: 7.3.1
5. Drancourt M, Carrieri P, Gevaudan MJ, Raoult D. Blood agar and Mycobacterium tuberculosis: the end of a dogma. J Clin Microbiol 2003; 41: 1710-11.
6. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. The Lancet Infect Dis 2003; 3: 141-7.
7. Manterola JM, Thornton CG, Padilla E, Lonca J, Corea I, Martinez E, Ausina V. Comparison of the sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide specimen processing method with the C18-Carboxypropylbetaine specimen processing method using the MB/Bac T liquid culture system. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 35-42.
8. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. Mycobacterium In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds). Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington DC: ASM Press. 1999: 399-437.
9. Somoskovi A, Ködmön C, Lantos A, Partfai Z, Tamasi L, Füzy J, Magyar P. Comparison of recoveries of Mycobacterium tuberculosis using the automated Bactec MGIT 960 system, the Bactec 460 TB system, and Löwestein-Jensen medium. J Clin Microbiol 2000; 38: 2395-7.

10. Strong BE,Kubica GP. Isolation and Identification of Mycobacterium tuberculosis. A guide for the level 2 laboratory.Centers for Disease Control. Atlanta ,HHS Publication no.(CDC) 81-8390.
11. Whyte T, Hanahoe B, Collins T, Corbett-Feeney G, Cormican M. Evaluation of the Bactec MGIT 960 and MB/Bac T systems for routine detection of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 2000; 38: 3131-2.
12. Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the Bactec MGIT 960 and ESP Culture system II for growth and detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 2000; 38: 4167-70.
13. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. Infect Dis Clin North Amer 2002; 16: 127-44.
14 Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) HHS Publication (CDC), 4th Edition. May 1999.
15 Dunlap NE, Bass J, Fujıwara P, et all. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1376–1395.
16 Forbes BA,, Sahm DF, Wissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 10th. Ed. St.louse, Missouri: Mosby-Year Book. 2002:547-8.
17 WHO. Guidelines for the Safe Transport of Infectious Substances and Diagnostic Specimens WHO/EMC/97.3.
18 Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Atlanta: HHS Publication (CDC),. 1985: 21-30.
19 Winn WC, , Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL.Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th. Ed. Philadelphia, Newyork: Lippincott Williams&Wilkins. 2006:1064-11244.
20 Master RN. Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: ASM, 1992: 3.2.1-6.
21 Pfyffer GE, Brown-Elliot BA, Wallace RJ. Mycobacterium: General characteristics, isolation and staining procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH eds. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington DC: ASM; 2003:532-59.
22 CDC. Packaging, Labeling and Shipping Infectious Substances. Public Healt Practice Program Office, CDC (www.phppo.cdc.gov/nltn/pdf/2000/3.0/shipdoc4.pdf)
23 Strong BE, Kubica GP. Isolation and identification of Mycobacterium tuberculosis: A Guide for the Level II Laboratory. Atlanta: HHS Publication (CDC), 1979:35-42.

DİREK MİKROSKOPİ TEKNİKLERİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Uzm. Dr. Nevin SARIGÜZEL SAR
Üsküdar Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Mikobakteriler için başlıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir:
1. Karbol fuksin yöntemi (Ziehl- Neelsen, Kinyoun): Aside dirençli mikroorganizmalar ışık mikroskobunda kırmızı renkte görülür.
2. Florokrom yöntemi (auramin O, auramin-rhodamin): Aside dirençli mikroorganizmalar florasan mikroskopta sarımsı - turuncu renkte floresan verirler.
Aside dirençli boyama mikobakterilerin lipidden zengin hücre duvarlarının primer boya ile boyanması ve renk giderici ajan asit ve alkolle muameleden sonra boyalı kalması esasına dayanmaktadır. Bu nedenle mikroorganizma aside dirençli basil (ARB) olarak adlandırılır.

Direk mikroskopi ile görülebilmesi için, balgamın her ml' sinde 5000-10000 basil bulunması gereklidir. Direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığı % 22-80 arasında değişkenlik gösterir.

Duyarlılığı etkileyen faktörler;

- Örneğin tipi,
- Enfekte eden mikobakteri türü,
- Dekontaminasyon ve kontaminasyon işleminin etkisi,
- Boyama tipi,
- Yaymanın kalınlığı,
- Yaymayı inceleyen laboratuvar personelinin deneyimi.

Yaymanın Hazırlanması: Lamın kırılması, boya başarısızlığı gibi problemler veya düşük miktarda organizma içeren pozitiflikleri doğrulamak için en az iki yayma hazırlanması gereklidir.

A. BOS dışı klinik örnekler :

- Etanol ile temizlenmiş çiziksiz her lama hasta protokol no'su yazılır.
- Yayma işlemi öncesi örnekler iyice vortekslenir.

- Örnek öze veya pipet kullanılarak lama transfer edilir. İşlem görmemiş örneklere ait preparat hazırlamak için kanlı, mukoid ve nekrotik kısım kullanılır.
- Örnek lam üzerine orta bölümde oval tarzda yayılır. Yoğun materyalden preparat hazırlandığı durumlarda; bir lam üzerine alınan materyal, ikinci bir lam ile bastırılır ve iki lam arasında yayılımı sağlayacak şekilde zıt yönde çekilir.
- Öze yeniden kullanılmadan önce iyice alevden geçirilir.
- Pipetler kullanım sonrasında dezenfektana veya tıbbi atık kabına bırakılır.
- Preperatların biyolojik güvenlik kabininde kurutulması önerilir.
- Yayma preparatlar aşağıdaki yöntemlerden biri ile lama tespit edilir.

a) Elektrikli lam ısıtıcısı (65-70°C)' nda en az 2 saat süreyle bekletilir. Gece boyunca kalması kabul edilebilir.

b) Lamlar, bek'in mavi alevinden 3 veya 4 kez geçirilir, fazla ısıtılmaz.

c) Lamlar saf metanolde 1 dakika süreyle bekletilir.

Not: Isı ile tespit, tüm mikobakterileri öldüremeyebilir. Bu nedenle lamların bulaştırıcı olabileceği unutulmamalı ve incelemeyi takibeni tıbbi atık kaplarına atılmalıdır.

B. BOS örnekleri:

- BOS sedimenti vortekslenir
- Steril pastör pipeti ile lamın merkezine damlatılır.
- Preparat havada kurutulur.
- Damlatma işlemi iki kez daha tekrarlanır, her defasında yeni damla doğrudan önceki damlanın üzerine damlatılır.
- Daha önceden tanımlanan yöntemlerden biri ile tespit edilir.

A. KARBOL FUKSİN BOYAMA

1. Ziehl-Neelsen karbol fuksin

a) Solüsyon 1. 10 ml % 95 etanolde 0.3 g bazik fuksin çözülür.

b) Solüsyon 2. 100 ml distile suda 5.0 g fenol kristalleri çözülür (hafif ısıtma gerekebilir).

Çalışma solüsyonu : Solüsyon 2' nin 90 ml'si solüsyon 1'ile 100 ml' ye tamamlanır.

2. Kinyoun'un karbol fuksin

a) Solüsyon 1 : 20 ml % 95 etanolde 4.0 g bazik fuksin çözülür.

b) Solüsyon 2 : 100 ml distile suda 8.0 g fenol kristalleri çözülür. Isıtmak gereklidir.

Çalışma solüsyonu : Solüsyon 1 ve 2'nin tamamı birleştirilir.

B. RENK GİDERİCİ AJAN

% 3 asid - alkol

3 ml konsantre hidroklorik asidi, 97 ml % 95 etanol'e dikkatlice eklenir.

C. ZIT BOYA

Metilen mavisi veya brilliant yeşili zıt boya olarak kullanılabilir.

1) Metilen mavisi : 100 ml distile suda 0.3 g methylen blue chlorid'i çözülür.

2) Brilliant yeşili : 100 ml distile suda 1.0 g brilliant green çözülür.

NOT: Hazırlanan boya ve solusyonların adı, hazırlama ve son kullanma tarihi şişe üzerine etiketlenir. Hazırlanan solusyonlar 3 aydan sonra kullanılmamalıdır.

KALİTE KONTROL

Her boyama işleminde negatif ve pozitif kontrol çalışılmalıdır. Kalite kontrol yaymaları aşağıdaki şekilde hazırlanır.

- Escherichia coli (negatif kontrol) ve Mycobacterium tuberculosis H37Ra ATCC 25177 (pozitif kontrol) suşları, 1.0 ml fizyolojik tuzlu su veya steril distile suda ayrı ayrı No.1 Mc Farland bulanıklık standardında ve biyolojik güvenlik kabininde süspansiyonları hazırlanır.

Not: Mycobacterium kansasii gibi daha az patojenik organizmalar pozitif kontrol amaçlı kullanılabilir. Ancak hızlı üreyen mikobakteriler'in aside dirençli boyaları tutmaları değişkenlik gösterdiğinden kullanılmazlar.

- Kontrol lamlar etiketlenir. Üzerine hazırlama tarihi ve hazırlayanın adı kaydedilir.
- Negatif kontrol süspansiyonundan tek kullanımlık bir pipetle lamın ucuna yakın bir damla damlatılır.
- Pozitif kontrol süspansiyonu ile üçüncü basamak tekrarlanır, damla negatif kontrol ve lam etiketi arasına damlatılır.
- Yaymalar tercihen biyolojik güvenlik kabininde havada kurutulur ve tespit edilir
- Lamlar etiketli lam kutusunda saklanır.

Kontrol lamlar ticari olarak temin edilebilir.

DEĞERLENDİRME:

I. Hasta yaymaları okunmadan önce kontrol lamları değerlendirilir. Karbol fuksin (Ziehl-Neelsen veya Kinyoun):

1) Mycobacterium spp.: Kullanılan zıt boyaya bağlı olarak mavi veya yeşil zeminde kırmızı renkte,

2) E.coli: Kullanılan zıt boyaya bağlı olarak mavi veya yeşil renkte görülür.

II. Kontrol lamın sonuçları kaydedilir. Sonuçlar kabul edilebilirse hasta yaymaları incelenir. Kontrol lamı uygun değilse, boyaların hazırlanması ve işlemleri yeniden gözden geçirilir.

Değerlendirme sonucu kabul edilemez kontrol lamları şunlardır:

1) Pozitif kontrolde basiller kırmızı renkte görülmüyorsa

2) Negatif kontrolde basiller kırmızı renkte görülüyorsa.

3) Zemin gereği şekilde dekolorize olmamışsa.

Problem ortaya çıktığı zaman tüm hasta lamları ve bir kontrol lam yeniden boyanır.

BOYAMA İŞLEMLERİ

A. ZİEHL-NEELSEN (SICAK KARBOL FUKSİN) BOYAMA:

- Tüm lam karbol fuksin boya ile kaplanır.
- Bek veya elektrikli boyama rafı kullanarak buhar çıkacak kadar (sigara dumanı tarzında) lam alttan yavaşça ısıtılır.
- Düşük ısıyla veya aralıklı ısı kullanarak 3-5 dakika süreyle buharlaşması devam ettirilir.
- Lam soğumaya bırakılır ve takiben su ile yıkanır.
- % 3 asit-alkolle lam kaplanır ve renk akmayıncaya kadar renk giderme işlemi uygulanır.
- Lam su ile iyice yıkanır, fazla su lamdan akıtılır.
- Lam üzerine zıt boya (metilen mavisi veya brilliant yeşili) ilave edilir ve 20-30 saniye boyanır.
- Çeşme altında su ile iyice yıkanır ve fazla su lamdan akıtılır.
- Yayma havada kurutulur. (Kurutma kağıdı kullanılmamalıdır).
- Preparat 100'lük immersiyon objektifi ile incelenir.

B. KİNYOUN KARBOL FUKSİN (SOĞUK KARBOL FUKSİN) BOYAMA:

- Tüm preparat karbol fuksin ile kaplanır.
- Yayma 2 dakika süreyle boyanır.
- Lam suyla yıkanır.
- Lam % 3 asit-alkolle kaplanır ve renksizleştirme işlemi yapılır.
- Su ile yıkanır ve fazla su lamdan akıtılır.
- Lam zıt boya ile (metilen mavisi veya brilliant yeşili) kaplanır.
- Zıt boya ile 20-30 saniye boyanır.
- Su ile iyice yıkanır, fazla su lamdan akıtılır.
- Yayma havada kurutulur. Kurutma kağıdı kullanılmaz.
- Preparat 100'lük immersiyon objektifi ile incelenir

YAYMANIN İNCELENMESİ

A. İnceleme Yöntemi:

- Aside dirençli basilin varlığı için, her yayma en az 15 dakika süre ile incelenir.
- Yaymayı negatif olarak raporlamadan önce karbolfuksin boyama ile minimum 300 alan incelenmelidir.
- Yaymanın uzun kenarı boyunca 3, kısa kenarı boyunca 9 paralel tarama yapılmalıdır. Bu hem geniş bir okuma alanı sağlar, hem de aynı bölgenin birden fazla okunması olasılığını uzaklaştırır.

MORFOLOJİK ÖZELLİKLER:

- Aside dirençli basil yaklaşık olarak 1-10 µm uzunluğunda ve tipik olarak kırmızı, ince, tekli veya demetler halinde çomak şeklinde görülür.
- Bakteri, boncuk dizisi tarzında boyanma bölgeleri gösterebilir.
- M. tuberculosis dışında bazı mikobakteriler pleomorfik görünebilir, uzun basillerden kokoid formlara kadar değişmektedir.

SONUÇLARI RAPOR ETME:

Boyama sonuçları 24 saat içinde klinisyene bildirilmelidir.

ARB negatif : Aside dirençli basilin görülmediği tüm yaymalar " Aside dirençli basil görülmedi '' şeklinde raporlanır. Negatif raporlanan yaymalar kültür rapor edilinceye kadar saklanmalıdır.

ARB pozitif : Bir yaymada aside dirençli basil görüldüğü zaman, "Aside dirençli basil görüldü '' şeklinde rapor edilir. Boyanma yöntemi belirtilerek yaymada gözlenen basil sayısına göre skorlama yapılır.

RAPOR	GÖRÜLEN ARB MİKTARI (BASİL SAYISI / İNCELEME ALANI)		
	Fuksin boya	Florokrom boya	
	1000 X	250 X	450 X
Negatif	0	0	0
Şüpheli (örnek tekrarı)	1-2/300alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
1+	1-9/100alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
2+	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
3+	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
4+	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/1 alan

Alışılmadık sıklıkta yayma pozitif (kültür negatif) sonuç ile karşılaşılır ise, yanlış pozitiflik nedenleri araştırılmalıdır.

- Su, su tankları ve boyalar aside dirençli mikroorganizmalarla kontamine olabilir.
- Boyama işlemi süresince materyalin lamdan lama transferi oluşabilir.
- İmmersiyon objektifi için kullanılan yağ ile aside dirençli organizmaların transferi oluşabilir. Pozitif bir yaymadan sonra lens mutlaka temizlenmelidir.

ARB boyama:

A. Mikobakteriden başka Rhodococcus spp., Legionella micdadei, Cryptosporidium spp.'nin kistleri ve Isospora spp. gibi bazı mikroorganizmaların ARB boyanabildiği dikkate alınmalıdır.

B. Hızlı üreyen mikobakteriler boyanmada değişkenlik gösterebilirler.

C. Pozitif yayma preparatları bir başka uzman tarafından da doğrulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Nolte FS, and Metchbock B. Mycobacterium. In Murray PR, Baron E Jo, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (ed). Manual of clinical microbiology. Sixth edition. ASM Press, Washington DC. 1995; 400- 437.
2. Brown BA, Swenson JM, Wallace RJ, Jr. Acid- fast Stain Procedures. In Isenberg HD, (ed). Clinical microbiology procedures handbook. ASM Press, Washington DC, 1992; p.3.5.1- 3.5.11.
3. Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, Hopewell P, Hersburg CR, Salfinger M, Simone PM. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med, 2000; 161: 1376- 1395.
4. Somoskövi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, O'Donnell D, Parsons LM, Salfinger M. Lessons from a proficiency testing event for acid- Fast microscopy. Chest 2001; 120: 250- 257.
5. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. Infect Dis Clin North Am, 2002; 16(1): 127- 144.
6. Saniç A, Çoban AY. Mikobakteriler ve laboratuar tanı. Ondokuz Mayıs Üni Tıp Fak Mik ve Kl Mik ABD, Samsun. 1999; 38-41.
7. Fukunaga H, Murakami T, Gondo T, Sugi K, Ishihara T. Sensivity of acid- fast staining for Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed tissue. Am J Respir Crit Care Med, 2002;166(7):994-7.
8. Ba F, Rieder HL. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid- fast bacilli. Int J Tuberc Lung Dis, 1999; 3(12): 1101- 5.
9. Kumar N, Tiwari MC, Verma K. AFB staining in cytodiagnosis of tuberculosis without classical features: a comparison of Ziehl- Neelsen and fluorescent methods. Cytopathology, 1998; 9(3):208-14.

Saceanu CA, Pfeiffer NC, McLean T. Evaluation of sputum smears concentrated by cytocentrifugation for detection of acid-fast bacilli. J Clin Microbiol 1993; 31:2371-2374.

AURAMİNE – RHODAMİNE FLORESAN BOYAMA

Doç. Dr. Vildan AVKAN OĞUZ
DEÜ Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD.

Direkt mikroskopi teknikleri konusunun girişinde verilen genel bilgiler ve yayma preparatın hazırlanması aşamaları hem karbol fuksin boyama hem florokrom boyama yöntemlerinde aynıdır. Rutinde tanı amaçlı en sık karbol fuksinli (Erlich Ziehl Neelsen- EZN , Kinyon) boyama kullanılmakla birlikte, daha duyarlı ve hazırlanan preparatın daha hızlı taranmasını sağlayan florokrom boyalar da kullanılabilir. Bu boyama yöntemlerinde, daha küçük bir büyütme ile daha geniş bir alan taranabilir ve preparatın taranması için gereken zaman azalır. Bu nedenle özellikle zaman problemi olan ve fazla sayıda hasta örneğinin işlemlendiği laboratuvarlarda, florokrom boyama yöntemleri hem tanı için hem de antitüberküloz tedavi alan hastaların izleminde tercih edilebilir.

Florokrom boyamada ana ilke fenollü fuksin yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Floresan boyalar, mikobakterilerin lipitten zengin hücre duvarına bağlanarak, görünür hale gelmesini sağlar. Ancak boyaların hazırlanması, amaçlanan hedef (doku, mikroorganizma, antijen antikor kompleksi vs.) ve boyama işlemi sırasında ısı-süre değişikliklerinin uygulanması gibi, bazı kriterlere göre, farklı floresan boyama yöntemleri uygulanabilir. Bu yöntemler arasında Auramin-Fenol boyama yöntemi, Glikerson ve Kanner'in floresanlı boyama yöntemi, Auramine-Rhodamine boyama yöntemi, Truant'ın modifiye Auramine-Rhodamine boyama yöntemi sayılabilir. Kullanılan auramin'in karsinojen olduğu unutulmamalı, özellikle direkt temas-hava yolu izolasyon önlemleri alınmalıdır.

AURAMİN-RHODAMİNE BOYAMA İŞLEM BASAMAKLARI

A. Örneklerin Hazırlanması : Karbol Fuksin boyama yönteminde anlatıldı.

B- Kimyasal Maddelerin Hazırlanması

1. Auramine – Rhodamine Floresan Boyanın Hazırlanması

Auromin O----------	1,5 gr.
Rhodamin B----------	0.75 gr
Gliserol----------	75 ml
Sıvı fenol----------	10 ml
(Isıtılmış fenol 10 ml + dH_2O 50ml)	
Saf su ----------	50 ml

Önce fenol sonra boyalar eklenerek suda eritilir. En son gliserol eklenir. Süzülürek 4°C'de koyu renkli bir şişede saklanır

2.Asit Alkol Hazırlanması

Etil alkol (% 70'lik) ---------- 99.5 ml

Konsantre HCl---------- 0.5 ml

3.Karşıt Boya Çözeltisi Hazırlanması

Potasyum permanganat ($KMnO_4$) --------- 0.5 gr

Distile su---------- 100 ml

C- Kalite Kontrol

Her boyama için mutlak pozitif ve negatif kontroller hazırlanmalıdır.

Pozitif kontrol hazırlanması: Middleebrook 7H9 sıvı besiyeri içinde mikobakteri (mümkünse standart M tuberculosis H37Rv) süspansiyonu hazırlanır.Bu süspansiyondan lam üzerine bir damla konularak ya ısıtıcı blokta ya da havada kurutulup, tespit edilir.

Negatif kontrol hazırlanması: Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa ile sıvı besiyerinde hazırlanan süspansiyondan bir damla lam üzerine konularak ya ısıtıcı blokta ya da havada kurutulup, tespit edilir.

D- İşlemin Uygulanması

- Oda ısısında saklanan boyalar kullanılmadan önce mutlaka iyice çalkalanmalıdır.
- Hazırlanan lamlar alevde fiske edilir. (Resim 1)
- Hazırlanan lamların üzerine AR boyası dökülür ve 15-20 dakika oda ısısında beklenir. Boya lamın üzerini tamamen kaplamalı ve eksilmemelidir (Resim 2,3).
- Distile su ile yıkanır. Klorsuz su kullanılmalıdır, çünkü klor floresanı azaltır (Resim 4).
- Yıkama sonrası % 0,5 asit alkol dökülerek 2–3 dakika beklenir. Yeterli dekolarizasyon işleminde çıplak gözle boya görülmez(Resim 5–7).
- Yıkama işlemi tekrarlanır (Resim 8).
- Zemin boyası olarak hazırlanmış $KMnO_4$ ile 2 dakika boyanır. Süre uzatılırsa floresan azalabilir (Resim 9).
- Yıkanır ve havada kurutulur (Resim 10).
- Pozitif bir yaymada mikobakteriler, karanlık bir zeminde sarı-turuncu parlak, ince, kıvrık içi tanecikli floresan veren bakteriler olarak görülür (Resim 11)
- Her örneğin boyanması sırasında, mutlaka pozitif ve negatif kontrol kullanılmalıdır.

• Boyanan preparatlar en kısa sürede 25x ya da 40x büyütme ile floresan mikroskobunda incelenmelidir. Basil morfolojisi x1,000 ya da x450 büyütme ile kontrol edilmelidir.

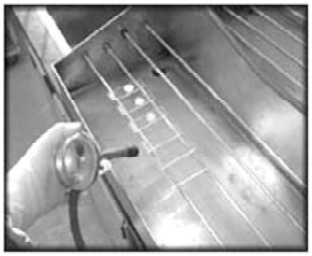
• Gerekirse pozitif değerlendirilen preparatlar, EZN ya da Kinyon boya ile boyanabilir.

E. SONUÇLARIN BİLDİRİMİ:

Negatif: Floresan görülmeyen tüm yaymalar " Aside dirençli basil görülmedi '' şeklinde raporlanır.

Pozitif: Karanlık bir zeminde sarı-turuncu parlak, ince, kıvrık içi tanecikli floresan veren bakteriler olarak görülür "Aside dirençli basil görüldü'' şeklinde rapor edilir. Boyanma yöntemi belirtilir ve yaymada gözlenen aside dirençli basilin miktarı hakkında bilgi verilir. Basilin miktarı hakkındaki değerlendirmede karbol fuksin boyama yönteminde kullanılan tablo rehber olarak kullanır.

Resim 1–11: Auramine – Rhodamine Floresan Boyama işleminin resimlerle izlemi



1



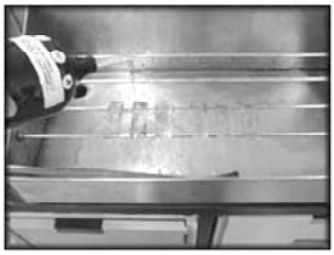
2



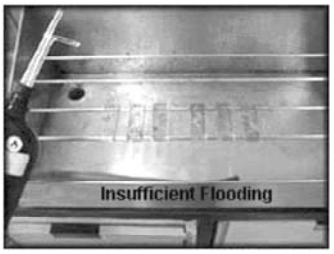
3



4



5



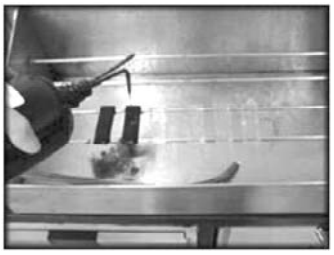
6



7



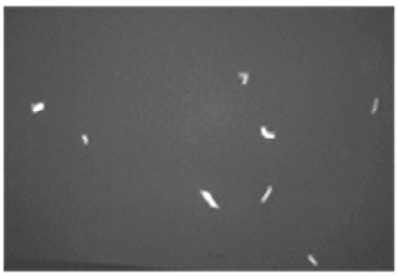
8



9



10



11

KAYNAKLAR

1. Weitzman I. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook ASM Press, Washington DC, 2004; 7.2.1- 7.3.1.
2. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İkinci basım Barış yayınları. İzmir 1995 : 83-84.
3. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth edition Lippincott, Philadelphia.1997: 903 – 905.
4. Uzun M. Tüberküloz tanısında Ehrlıch-Ziehl-Neelsen, Fluorokrom boyama yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein-jensen Kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi Doktora tezi. İstanbul Tıp Fakültesi. 1994.
5. Baron JB, Peterson LR,Finegold SM. Bailey Scott's Diagnostic Microbiology 9th edition. Mosby-Year Book, St Louis, Missouri. 1995:605-608.
6. Nolte FS, Metchock B. Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ,Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH eds. Manuel of Clinical Microbiology 6th ed. Washington. ASM Press. 1995: 400-38.
7. http://www2.provlab.ab.ca/bugs/mycob/afb_stain/znstain.htm

TÜBERKÜLOZ BASİLİNİN KLASİK YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU

Prof.Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Manisa

Tüberküloz basillerinin tanımlanmasında kullanılan klasik yöntemler bakterilerin üreme hızına, üreme ısısına, koloni görünümüne, pigment üretimine ve biyokimyasal özelliklerine dayalı yöntemlerdir. Bu yöntemler zaman alıcı ve uygulanması zor olmakla birlikte maliyetleri yeni yöntemlere göre oldukça düşüktür.

A. ÜREME ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

1. Koloni ve Mikrokoloni Görünümü

M. tuberculosis

- Lowenstein Jensen (LJ) besiyerinde veya Middlebrook agarda 370C'de 14-28 günlük inkübasyondan sonra pigmentsiz, düzensiz, kuru, krem renkli koloniler oluşturur.
- Middlebrook 7H10 veya 7H11 agarda 5-10 günlük inkübasyondan sonra oluşan mikrokoloniler mikroskop altında incelendiğinde "yılanvari kordon" görünümü izlenir.
- Petrilere ince dökülmüş agarlı besiyerindeki mikrokoloniler 10X objektif ile mikroskopta incelenmelidir.

M. bovis

- Çok yavaş (disgonik)ürer. LJ'de görünür kolonilerin oluşması için 6-8 haftalık inkübasyon gereklidir.
- En iyi üreyebildigi ortam gliserolsüz %0.4 pirüvatlı LJ'dir. Yumurtalı besiyerinde düzgün veya bazen düzensiz kenarlı, krem renkli, küçük koloniler oluşturur. Middlebrook 7H11 agarda çok küçük, su damlasına benzer koloniler oluşturur.

2. Üreme Hızının ve Pigment Üretiminin Saptanması

Mikobakteriler üreme hızları, tercih ettikleri üreme ısıları ve ışıkta veya ışık olmadan pigment üretme özelliklerine göre sınıflandırılabilmektedir. Bu sınıflandırma (Runyon) 1950'li yıllardan beri geçerliliğini korumaktadır. Tüberküloz basilleri yavaş üreyen, nonfotokromojen (veya nonkromojen) koloniler yapar.

Gereçler:

1 Middlebrook 7H9 broth veya Dubos Tween broth ve LJ yatık besiyeri

2 Steril vidalı kapaklı tüpler (20 X 110 veya 20 X 125 mm)

3 Steril plastik çubuklar ve pastör pipetleri

4 Besiyerinin üzerini kapatacak büyüklüklerde (yaklaşık 10X15 cm) alimünyum folyo parçaları

5 60-W aydınlatma gücünde lamba

Kalite Kontrol:

Aşağıda verilen kontrol suşları ile test ayda bir kez kontrol edilmelidir.

1 M. terrae ATCC 15755: Yavaş ürer, oda ısısında ± ürer, ışıkta veya karanlıkta pigment yapmaz (nonkromojen).

2 M. fortuitum ATCC 6841: Hızlı ürer, oda ısısında iyi ürer, ışıkta veya karanlıkta pigment yapmaz (nonkromojen).

3 M. gordonae ATCC 14470: Yavaş ürer, oda ısısında zayıf ürer, ışıkta ve karanlıkta turuncu pigment yapar (skotokromojen).

4 M. kansasii ATCC 12478: Yavaş ürer, oda ısısında çok zayıf ürer, ışıkta turuncu pigment yapar, karanlıkta pigment yapmaz, ışık testinden sonra pigment oluşumu gözlenir (fotokromojen).

Yöntem:

- Test edilecek koloniler Middlebrook 7H9 broth besiyerine ekilir. Bir çubuk ile tüpün kenarında iyice ezilerek kolonilerin sıvı besiyeri içinde dağılması sağlanır.
- Tüpler vorteks aracılığı ile 10 saniye karıştırıldıktan sonra bir pastör pipeti aracılığı ile altışar damla kültür süspansiyonu alınarak üç ayrı LJ besiyerine ekilir.
- LJ besiyerlerinden iki tanesi besiyerinin tamamını örtecek şekilde hemen alüminyum folyo ile kapatılır. Tüplerin kapakları gevşek bırakılmalıdır.
- Kapalı tüplerden biri oda derecesinde (220-250C), diğer kapalı tüp ile açık bırakılan tüp 370C'de %10 CO2'li ortamda inkübe edilir.
- Açık tüp haftada bir kez olmak üzere üç hafta süre ile üreme miktarı ve pigment üretimi yönünden incelenir. Üçüncü haftanın sonuna kadar alimünyum folyo açılmaz.
- Koloni rengi kaydedilir. Üreme skoru (0) – (2+) olarak belirlenir (Tablo 1)
- Üçüncü haftanın sonunda folyo açılır. Açılan tüplerde üreyen kolonilerin rengi kaydedilir. Açık tüpler daha fazla ışığa maruz kaldığından bu tüplerde üreyen kolonilerin pigmentleri kapalı olanlara oranla genellikle daha koyudur.

Aynı zamanda oda ısısında üreyen kolonilerin pigmentleri ısı derecesine bağlı olarak daha açık renktedir. Renk tonu kıyaslanmamalı, sadece sarı veya turuncu pigmentin olup olmadığı incelenmelidir.

Tablo 1. Besiyerinde üreme hızı*

37⁰'de Üreme hızı	1. Hafta	Üreme Miktarı 2. Hafta	3. Hafta
Hızlı	1+ - 2+		
Orta	± - 1+	2+	
Yavaş	0 - ±	1+	2+

** 0; görünür koloni yok, ±; yüzeyde çok az sayıda küçük kolonilerin görülmesi veya çok hafif pigment oluşumunu düşündüren görünüm, 1+; az sayıda iyi üremis kolonilerin görülmesi, kolonilerin arasından LJ besiyeri seçilebilir, 2+; çok sayıda iyi üremis kolonilerin görülmesi, koloniler birbirine çok yakındır veya temas halindedir ve kolonilerin arasından besiyerinin yüzeyi görülemez.*

Değerlendirme

- Açık ve kapalı tüplerde üreyen kolonilerde pigment yok (krem rengi); Nonkromojenik
- Açık ve kapalı tüplerde üreyen kolonilerde pigment var (sarı-turuncu); Skotokromojenik
- Işık testi : Açık tüpte üreyen koloniler pigmentli, kapalı tüpte üreyenler renksiz ise kapalı tüpe ışık testi uygulanır. Kapalı tüpte bulunan pigmentsiz kolonilerde, ışıkla karşılaştıktan sonra pigment üretimi var; Fotokromojenik

Bu amaçla besiyeri 25 cm uzaklıkta bulunan 60 W gücündeki lambanın altında bir saat tutulur. Daha sonra başlangıçta tüpün bekletildiği ısıda inkübe edilir. Kapağı gevşek bırakılmalıdır. 24 saatlik inkübasyonun sonunda koloniler pigment oluşumu yönünden yeniden incelenmelidir. Sarı veya turuncu pigment varlığı kaydedilir. Pigmentin koyuluğu değil, varlığı aranmalıdır.

3. Bactec NAP (p-Nitro-a-acetylamino-ß-hydroxypropiophenone) **Testi**
NAP M. tuberculosis complex'in üremesini selektif olarak inhibe eder. Diğer

mikobakteri türleri NAP ile inhibe olmaz veya kısmen inhibe olabilir. Üreme yoksa bakterinin M. tuberculosis complex'e ait olduğu düşünülür. Ancak NAP testinin nükleik asit prob, kromotografik yöntemler veya konvansiyonel yöntemler ile doğrulanması önerilmektedir.

İnceleme Örnegi

BACTEC 12B besiyeri (Growth index > 50 ise)

Gereçler

- BACTEC 460 cihazı (Becton Dickinson Diagnostic Systems)
- Middlebrook 7H12 (BACTEC 12B) besiyeri (7H9 broth, sığır serum albümini, kazein hidrolizat, katalaz ve 14C işaretli substrat içerir.)
- BACTEC NAP flakonları (5 µg NAP diski taşır).
- Steril tüberkülin enjektörleri
- Pamuk veya gazlı bezli petler, antimikobakteriyel dezenfektan ve %70 etil alkol

Kalite Kontrol Suşları

M. tuberculosis ATCC 27294 ve M. kansasii ATCC 35775; M. tuberculosis'in growth index'inde (GI) ≥%20 azalma gözlenirken, M. kansasii'nin GI inkübasyon sürdükçe yükselen bir eğri çizer.

Yöntem

- BACTEC 12B şişesinde GI 10 olduğunda çukulata agara ekilir, kontaminasyon olmadığı doğrulanır. GI yaklaşık 50-100'e ulaşıncaya kadar besiyerleri günlük olarak okunur ve yayma hazırlanarak ARB'nin varlığı gösterilir.
- 12B şişesinin GI'i 50-100'e ulaştığında, besiyeri iyice karıştırılır. Aseptik koşullarda 1 ml besiyeri NAP flakonuna aktarılır Kalan 3 ml besiyeri kontrol olarak kullanılır.
- GI 100'ü geçen kültürler için NAP testinden önce ekim yapılmamış BACTEC 12B besiyeri (Middlebrook 7H12) ile dilüsyon yapmak gereklidir. Dilüsyon oranları aşağıda gösterilmiştir.

GI Miktarı	Dilüsyon
50-100	Dilüsyon yapılmaz
101-200	0.8 ml
201-400	0.6 ml
401-600	0.4 ml
601-800	0.3 ml
801-999	0.2 ml
999>1 gün	0.1 ml

- Dilüsyon yapıldıktan sonra besiyerinin 1 ml'si NAP flakonuna aktarılır.
- Artan besiyeri kontrol olarak kullanılmak üzere inkübe edilir.
- Flakonun ağzı etil alkolle dekontamine edilir ve iyice karıştırılır.
- Hem inokülasyon yapılan primer izolasyon şişesi (kontrol), hem de NAP flakonları günlük olarak 2-7 gün süre ile okunur, GI kaydedilir.

Değerlendirme:

- Sonuçlar 2-7 gün içinde değerlendirilir. Kontrol şişesinin GI'i artmasına rağmen NAP testi şişesinin GI'i azalıyor veya değişmiyorsa M. tuberculosis kompleks, artış gösteriyorsa tüberküloz dışı mikobakteri (MOTT) olarak değerlendirilir.
- Test sonucu dört günden daha kısa sürede değerlendirilmemelidir.
- M.tuberculosis kompleks dışında diğer mikobakterilerden M. kansasii, M. gastri, M. szulgai, M. terrae ve M. triviale'nin bazı suşları NAP ile kısmen inhibe olabilir. Bu durumda ilk 2-4 günlük okuma sonuçları yanlış değerlendirilebilir. Sonuç vermeden önce inkübasyonun 2-3 gün daha uzatılması bu hatayı önleyecektir.
- NAP testinde optimal inkübasyon ısısı önemlidir. Bazı mikobakteriler (M. marinum, M. chelonae) 300C'de ürer. 370C'de yapılan NAP testinde üremeleri inhibe olur. Bu nedenle yara veya deri örneklerinden üreyen mikobakterilerin ayrımı için NAP testinde inkübasyon ısısı hem 370C hem de 300C olmalıdır.
- Kontrol şişesindeki (orijinal kültür şişesi) günlük GI artmaya devam etmelidir, artış göstermiyorsa NAP sonucu değerlendirmeye alınmamalıdır.

o M. tuberculosis kompleks: İnokülasyondan sonra ardışık iki GI'de önemli bir azalma (%20); ilk iki gün hafif, fakat önemli olmayan bir artış ve ardından artışın olmaması veya azalma olması = TB kompleks

o Tüberküloz dışı mikobakteri: Günlük GI'in dört gün içinde 400 ve üzerine

çıkması; inokülasyondan sonra ilk 1-2 gün içinde artış olmaması veya hafif bir azalma, iki günün ardından önemli bir artış (%20) olması = Tüberküloz dışı mikobakteri

o Kültürlerin birden fazla mikobakteri türü ile veya diğer bakteriler ile kontamine olması, GI'in yükselmesine neden olur ve yanlış olarak tüberküloz dışı mikobakteri olarak değerlendirilir. Bu nedenle kuşkulu durumlarda ARB ve Gram boyama yapılmalıdır.

B. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİN İNCELENMESİ

I. Niasin Testi

Bütün mikobakteriler niasin ribonükleotid üretir. Ancak M. tuberculosis ile M. simiae ve M. chelonae'nın bazı suşları niasini nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) dönüştürecek enzime sahip değildir. Besiyerinde biriken niasin gösterilebilir. Niasin olumsuz M. tuberculosis suşları çok nadirdir. Niasin testi M. tuberculosis'in identifikasyonunda tek başına kullanılmamalıdır. M. tuberculosis identifikasyonunda sonuçlar nitrat redüksiyonu ve ısıya stabil katalaz testi ile doğrulanmalıdır. Niasin testi ticari olarak hazırlanmış kağıt stripler ile de yapılabilir. İnceleme Örneği : Niasin testi için LJ besiyerinde yoğun olarak üremiş dört haftalık kültürler kullanılmalıdır. Diğer besiyerlerinde yeterince niasin birikmediğinden yanlış negatif sonuç alınabilir. Diğer bakteriler ile kontamine kültürlerde niasin metabolize olduğundan yanlış negatif sonuçlar alınabilir.

Gereçler

1. %4'lük anilin

4 ml renksiz anilin 96 ml %95'lik etanole eklenir. Karıştırılır ve 20-80C'de koyu renk bir şişede saklanır. Solüsyonun rengi sarıya dönüştüğünde kullanılmamalıdır. Anilin karsinojeniktir. İnhalasyonu veya deri ile teması zararlıdır.

2. %10'luk siyanojen bromid eriyiği

Siyanojen bromidin doymuş bir çözeltisidir. Siyanojen bromid kristallerine steril distile su eklenerek hazırlanır. Boşalan şişeler atılmadan önce bol miktarda %10 NaOH ile yıkanmalıdır. Bu çözelti ile çalışırken son derece dikkatli olunmalıdır. Kuru kristaller patlayıcıdır. Ayrıca siyanojen bromid asitle birleştiğinde zehirli siyanür gazı oluşur.

3. Steril vidalı kapaklı tüpler (20 X 110 veya 20 X 125 mm), steril pastör pipetleri ve steril 5 ml'lik pipetler

Kalite kontrol

Pozitif kontrol; M. tuberculosis ATCC 25177

Negatif kontrol; MAC ATCC 13950 ve ekim yapılmamış besiyeri

Yöntem

- Dört haftalık ve yoğun üremesi olan LJ kültürleri kullanılmalıdır. Koloni sayısı az olduğunda yanlış negatif sonuçlar alınabilir.
- Besiyerine bir pastör pipeti dolusu steril su veya serum fizyolojik eklenir. Pipet ile koloniler yerlerinden kaldırılıp yana çekilerek suyun besiyeri ile teması sağlanır. Bu işlemin yapılmaması yanlış negatif sonuca neden olabilir.
- Tüpler horizontal olarak oda ısısında bir saat bekletilir. Bir pastör pipeti dolusu geri alınan sıvı temiz bir tüpe aktarılır.
- Tüpe birer pastör pipeti dolusu % 4 anilin ve siyanojen bromid eklenir.
- Kağıt strip yönteminde ise ayıraçlar yerine tüp içine strip konur ve hemen tüpün ağzı kapatılır. Tüp ara sıra çalkalanarak oda ısısında 15 dakika bekletilir.

Değerlendirme : Beş dakika sonra sarı renk oluşması pozitif sonuç olarak kaydedilir. Renk değişikliğinin görülmemesi negatif olarak değerlendirilir. Tüpler atılmadan önce eşit miktarda %10 NaOH eklenmelidir. Kağıt strip yöntemi ile ilgili olarak , beyaz zeminde değerlendirildiğinde sarı renk gözlenmesi pozitif kabul edilir. Kağıt stripler tehlikeli ayıraçların kullanımını gerektirmediğinden ve raf ömürleri uzun olduğundan avantajlıdırlar. Ancak az miktardaki niasini saptamada duyarlılıkları düşüktür.

II. Nitrat Redüksiyonu Testi

Mikobakteriler nitroredüktaz enzimi üreterek nitratları nitritlere indirgeyebilirler. Nitrat redüksiyonu testi; koloni morfolojisi, üreme hızı ve pigment üretme özellikleri birbirine benzer olan mikobakterileri ayırt etmede değerlidir. M. tuberculosis, M. kansasii, M. szulgai, bazı saprofit nonkromojenler, M. smegmatis ve M. fortuitum grubu nitrat redüktaz pozitiftir. Test niasin kağıt strip yöntemi ile de kombine edilebilir.

İnceleme Örnegi: LJ veya diğer yumurtalı besiyerinde üreyen 3-4 haftalık kültürler

Gereçler

1. Steril pastör pipetleri
2. M/45 fosfat tampon eriyiği (0.02M, pH 7.0) içindeki nitrat test substratı (0.01M)

$NaNO_3$	0.8 g
KH_2PO_4	1.17 g
Na_2HPO_4	1.93 g
H_2O	1000.0 ml (final volüm)

pH: 7.0 olmalıdır.

Çözelti otoklavda steril edildikten sonra buzdolabında 1-2 ay saklanabilir.

3. Sulfanilamid'in sudaki %0.2'lik eriyiği

0.1 gram sulfanilamid 50 ml distile suda çözünür. Tam çözünürlük için su banyosu gerekebilir. Çözelti koyu renkli şişelerde, buzdolabında bir aya kadar saklanabilir.

4. N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride'in sudaki %0.1'lik eriyiği

Koyu şişelerde, buzdolabında bir aya kadar saklanabilir.

Kalite Kontrol

Pozitif kontrol; M. tuberculosis ATCC 25177

Negatif kontrol; M. intracellulare ATCC 13950, ekim yapılmamış besiyeri

Yöntem

- Bir öze dolusu koloni 2 ml nitrat substratı içinde ezilir ve elle karıştırıldıktan sonra 350-370C'de iki saat inkübe edilir.
- Sırası ile aşağıdaki ayıraçlar eklenerek karıştırılır.

1 damla konsantre HCl

2 damla %0.2 sulfanilamid

2 damla N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride'in sudaki %0.1'lik eriyiği

- Karışım oda ısısında 5 dakika bekletilir ve pembe-kırmızı renk değişiminin varlığı araştırılır.

Değerlendirme: Pembe-kırmızı renk oluşması pozitif olarak kabul edilir. Bazı laboratuvarlarda renk değişimi kantitatif olarak değerlendirilmektedir. Beklendiğinde renk değişimi kaybolabildiğinden değerlendirme hemen yapılmalıdır.

III. Katalaz Testi

Katalaz hidrojen peroksidi (H_2O_2) su ve oksijene ayrıştıran hücre içi bir enzimdir. Oksijenin oluşumu hava kabarcıklarının ortaya çıkması ile anlaşılır. Katalaz

enziminin bazı formları 680C'de 20 dakika ısıtıldığında inaktive olur. Enzimin ısı ile inaktivasyonu bazı mikobakteri türlerinin ayırt edilmesinde değerli bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılan H2O2, diğer bakterilerde bulunan enzimin araştırılmasında kullanılan ayıraçtan farklıdır. Hidrofobik ve kümeli olan mikobakterilerin dağılmasını ve enzimin kolayca açığa çıkmasını sağlamak için testte %30 H2O2 (Superoxol) ile güçlü bir deterjan olan %10 Tween 80'nin karışımı kullanılır. Ayıraçlar taze hazırlanmış olmalıdır.

İnceleme Örnegi : LJ veya Middlebrook 7H10 agarda üreyen gelişmiş mikobakteri kolonileri

Gereçler

1. Middlebrook 7H9 broth
2. 25 X 150 mm büyüklüğünde vidalı kapaklı tüplerde hazırlanmış dik LJ besiyeri
3. %30 Hidrojen peroksit (Superoxol)
4. %10 Tween-80 (90 ml distile su+10 ml Tween 80 karışımı, her ikisi de ısıtılırsa karışımı hazırlamak kolaylaşir).
5. M / 15 fosfat tampon (0.067 M)

Kalite Kontrol

Negatif kontrol: M. tuberculosis ATCC 15177, 22-250C'de hava kabarcıkları oluşur, 680C'de oluşmaz.

Pozitif kontrol: M. fortuitum ATCC 6841, her iki derecede de hava kabarcıkları oluşur.

Yöntem : İki farklı yöntem uygulanır.

a. Isıya stabil katalaz testi

- İki ayrı tüpte test edilecek birkaç mikobakteri kolonisi (2-4 haftalık) 0.5 ml fosfat tampon içine inoküle edilir. Tüplerden biri 680C'lik su banyosunda 20 dakika bekletilir. Diğer tüp kontrol için kullanılır.
- Isıtılmış tüpün oda ısısında soğuması için bekletildikten sonra her iki tüpe de 0.5 ml Tween-H2O2 karışımı (1/1 oranda) eklenir ve gaz kabarcıklarının oluşumu gözlenir. Tüpler çalkalanmamalıdır. Negatif sonuç verilmeden önce 20 dakika beklenmelidir.

b. Semikantitatif katalaz testi

- Middlebrook 7H9'a bir öze dolusu koloni inoküle edildikten sonra tüp 370C'de yedi gün bekletilir.
- İnkübasyonun sonunda vorteks ile 5-10 saniye karıştırılır ve altı damla dik LJ besiyerine aktarılır. Besiyerleri 14 gün 370C'de inkübe edilir. Kapak gevşek bırakılmalıdır.
- İnkübasyonun sonunda besiyerine 1 ml H2O2-Tween karışımı eklenir (%30 peroksit cildi yakar, eldiven giyilmeli ve deri ile teması olduğunda soğuk su ile yıkanmalıdır). Tüp oda ısısında beş dakika bekletilir.

Oluşan hava kabarcıklarının yüksekliği ölçülür.

Değerlendirme : Isıya stabil katalaz testi: Çok az miktarda gaz kabarcığının oluşması bile pozitif olarak değerlendirilir. M. tuberculosis ve diğer bazı mikobakteriler 680C'de ısıtıldıklarında katalaz aktivitelerini kaybederler. Semikantitatif katalaz testi:

- Güçlü katalaz reaksiyonu: Hava kabarcıklarının yüksekliğinin ≥45 mm oluşması M. kansasii, hızlı üreyen mikobakteriler ve sıklıkla izole edilen skotokromojenler güçlü katalaz reaksiyonu verir.
- Zayıf katalaz reaksiyonu: Hava kabarcıklarının yüksekliğinin <45 mm olması. M. tuberculosis ve MAC zayıf katalaz reaksiyonu verir
- Negatif sonuç: Hava kabarcığının oluşmaması

Not: Çok eski kültürlerden veya yetersiz üreyen kolonilerden yapılan deneylerden yanlış olarak zayıf reaksiyon sonuçları alınabilir. Kültürler diğer bakteriler ile kontamine ise yanlış olarak güçlü reaksiyon sonuçları alınabilir.

IV. Thıophene-2-Carboxylıc Acıd Hydrazıde (TCH; T2H) İle Üremenin İnhibe Edilmesi

M. tuberculosis ve diğer yavaş üreyen mikobakterilerin çoğu TCH'ye dirençlidirler. M. bovis ise (Bazı INH dirençli suşlar hariç) düşük konsantrasyonda TCH'ye duyarlıdır ve TCH'li besiyerinde üreyemez. Bu test özellikle M. bovis ve M. tuberculosis'in ayrımında yardımcıdır. TCH testi Middlebrook 7H10 agarda uygulanabildiği gibi, antibiyotik duyarlılık testine benzer şekilde BACTEC sistemi kullanılarak da uygulanabilir.

İnceleme Örneği: LJ veya Middlebrook 7H10 agarda üreyen 3-4 haftalık kültürler

Gereçler

1. TCH duyarlılık besiyeri
2. 35-370C, %10 CO2 atmosfer koşulları için inkübatör
3. Steril distile su
4. Bölmeli petri plakları

Kalite Kontrol

Pozitif kontrol: M. bovis ATCC 35734 (10 µg/ml TCH'e duyarlı)
Negatif kontrol: M. tuberculosis ATCC 25177 (dirençli)

TCH duyarlılık besiyerinin hazırlanması

- İki adet 200 ml.lik Middlebrook 7H10 besiyeri hazırlanır. Besiyerleri otoklavda sterilize edilir. Su banyosunda 500C'ye kadar soğutulur.
- Soğumuş besiyerlerinden birinden 5.0'er ml pipet aracılığı ile petri plakların I. ve III. kadranına dökülür.
- Diğer besiyerine 1000 µg/ml'lik TCH stok solüsyonundan 2.0 ml eklenir ve iyice karıştırılır (final konsantrasyon; 10 µg/ml). Bu besiyerinden 5.0'er ml, II. ve IV. kadrana dökülür.
- Besiyerleri karanlıkta (koyu renk kağıda sarılı olarak), 2-80C'de bir ay süre ile saklanabilir.

Yöntem

- İncelenecek mikobakteri kolonilerinin steril distile suda 1 McFarland standardına uygun dilüsyonları yapılır.
- Üçer damla bakteri süspansiyonu, bir kontrol kadranına ve bir TCH'li kadrana inoküle edilir.
- Besiyerlerinin ışıktan korunması için kağıtla kapatıldıktan sonra, inokülumun absorbe olması için oda ısısında yaklaşık bir saat bekletilir. Besiyerleri ters çevrilerek 370C'de %10 CO2'li ortamda üç hafta inkübe edilir.
- İnkübasyonun sonunda kontrol kadranında ve TCH'li kadranda üreyen koloniler sayılır.

Değerlendirme : TCH'li besiyerinde üreyen koloni sayısı, kontrol besiyerinde

üreyen koloni sayısının %1'inden fazla ise dirençli kabul edilir.

V. Pirazinamidaz Testi

Pirazinamidaz enzimi pirazinamidi (PZA) pirazinoik asit ve amonyağa hidrolize eder. Pirazinoik asit besiyerine ferröz amonyum sülfat eklenmesi ile saptanabilir. Bu test M. marinum'u M. kansasii'den ve M. bovis'i M. tuberculosis'den ayırt etmede yardımcıdır. M. tuberculosis dört gün içinde pozitif sonuç verir. PZA direnci olan M. tuberculosis suşlarında ise test sonucu negatiftir. İnceleme Örnegi: LJ agar veya Middlebrook 7H10 agarda üreyen koloniler

Gereçler

1. Pirazinamidaz substrat besiyeri:

6.5 g Dubos broth base bir litre distile suda çözünür. Besiyerine; 0.1 g PZA, 2.0 g sodyum pirüvat ve 15 g agar eklenir. Besiyeri ısıtılarak çözündürülür. Vidalı kapaklı tüplere 5.0 ml miktarında dökülür. Tüpler 15 dakika 1210C'de steril edildikten sonra dik durumda agarın katılaşması için bekletilir. Besiyeri 2-80C'de altı ay saklanabilir.

2. %1 ferröz amonyum sülfat: Steril tüpler içinde ve steril distile su ile kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır.

Kalite Kontrol

Pozitif kontrol: M. intracellulare ATCC 13950
Negatif kontrol: M. kansasii ATCC 12478

Yöntem

- Bir öze dolusu genç koloni iki adet pirazinamidaz agarın yüzeyine inoküle edilir. Tüplerin kapakları gevşek bırakılarak inkübe edilir.
- Dört gün sonra tüplerden biri çıkarılarak besiyerinin üzerine 1 ml taze hazırlanmış %1 ferröz amonyum sülfat eriyiği eklenir. Oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra agarda pembe bir bant oluşumu gözlenir.
- Negatif tüpler dört saat daha buzdolabında bekletildikten sonra renk oluşumu yönünden yeniden incelenir.

Değerlendirme: Dört saat sonra agar yüzeyinde ayıraç tabakasında pembe renk oluşumu pozitif kabul edilir. Negatif sonuç alındığında ikinci tüpün inkübasyonu

yedi güne uzatılarak test tekrarlanır.

Tüberküloz basillerinin identifikasyonu için uygulanacak algoritma, laboratuvarda kullanılan besiyerine ve olanaklara göre değişkenlik gösterir. Katı besiyeri kullanan laboratuvarlarda üreme hızı, pigmentasyon, koloni görünümü ve mikrokoloni incelemesinden sonra niasin testi, nitrat redüksiyon testi ve ısıya stabil katalaz testinin uygulanması ile M. tuberculosis identifikasyonu yapılabilir. M. bovis ve M. tuberculosis ayrımı için TCH ile inhibisyon testi tercih edilmelidir. BACTEC sistemi kullanan laboratuvarlar için M. tuberculosis kompleksin identifikasyonunda NAP testi hızlı ve güvenilirdir. Aynı zamanda sıvı besiyerinde kord faktör oluşumu aranmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Lee LV. Procedures for identification from culture; conventional biochemicals. In Isenberg HD (ed): Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington DC, American Society for Microbiology, 2004; p: 7.6.11-7.6.1.12.

2. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds): Manual of Clinical Microbiology, Washington D.C: ASM Pres. 1999: 399-437.

3. Siddiqi S. Procedures for identification from culture; BACTEC NAP Test. In Isenberg HD (ed): Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington DC, American Society for Microbiology, 2004, p: 7.6.3.1-7.6.3.3.

ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST YÖNTEMLERİ

Yrd.Doç.Dr. Nuri ÖZKÜTÜK
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Manisa

M.tuberculosis complex'in (MTBC) anti tüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede en güvenilir ve en hızlı yöntemi bulmak amacıyla çok sayıda duyarlılık test yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar arasında proprosiyon yöntemini temel alan, kültüre dayalı klasik testler en yaygın kullanılan testlerdir. Proporsiyon yönteminde katı besiyeri olarak sıklıkla yumurta bazlı besiyerlerinden Löwenstein-Jensen (LJ), agar bazlı besiyerlerinden Middlebrook (MD) 7H10 kullanılmaktadır. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinin kullanıldığı antimikobakteriyal duyarlılık test yöntemlerinden BACTEC 460TB ve BACTEC-MGIT 960 gibi hızlı ticari sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. MD7H10'un kullanıldığı agar proporsiyon yöntemi ile BACTEC 460TB ve BACTEC-MGIT 960 yöntemleri NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory) tarafından önerilen yöntemlerdir. LJ'nin kullanıldığı proporsiyon yöntemi ise ekonomik olması nedeniyle DSÖ (Dünya Sağlık Örgütünün) tarafından önerilmektedir.

I. MİDDLEBROOK 7H10 BESİYERİNDE PROPORSİYON YÖNTEMİ (AGAR PROPORSİYON YÖNTEMİ)

Prensip: Proporsiyon yöntemi belli bir ilaç konsantrasyonunda (Kritik Konsantrasyon) dirençli olan organizmaların oranının belirlenmesini sağlar. Test edilecek bakteri suşu ilaçlı ve ilaçsız katı besiyerlerine inkübe edilir. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısıyla karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popülasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu oran %1'e (Kritik Proporsiyon) eşit veya daha yüksek ise test edilen suş o ilaca karşı dirençli olarak rapor edilir. NCCLS, katı besiyeri olarak MD7H10 besiyerinin kullanıldığı proporsiyon test yöntemini (Agar Proporsiyon Yöntemi) referans yöntem olarak kabul etmektedir.

Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması:

Antibiyotikler ticari toz şeklinde üretici firmadan alınmalı, klinik preparatları kullanılmamalıdır. Antibiyotikler üretici önerilerine göre veya olası ise vakumlu bir desikatör içinde –20oC'de saklanmalıdır.

- Antibiyotiklerin steril distile su ile veya uygun çözücüler ile (SM, INH ve EMB için su, RIF için metanol veya dimetilsülfoksit) 10 000µg/ml'lik (en az 1000 µg/ml olmalı) stok solüsyonları hazırlanır (yaklaşık olarak 100mg ilaç +10ml su).
- Stok solüsyonlar hazırlanırken gerekli miktar antibiyotik üzerinde belirtilen potense (% veya µg/mg) göre şu formüle göre hesaplanmalıdır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{İstenilen konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Potens (µg/mg)}}$$

Veya gerekli olan miktar hesaplanıp, potense bölünerek kullanılması gereken miktar bulunur. Ör: 100mg Streptomisin tartarak bir ilaç çözeltisi hazırlamak istediğimizde, ilacın potensi %80 (0.800µg/mg) ise 100/0.800=125mg tartmak gerekir. Stok solüsyonlar yaklaşık 100 mg'lık antibiyotik miktarı ile hazırlanmalıdır, çünkü daha küçük miktarlarda doğru tartım güç olabilir, daha büyük miktarlar ise ekonomik olmaz.

- Stok solüsyonu 0.22 µm por çaplı membran filtreden süzüp steril ettikten sonra, polipropilen tüplerde daha sonraki kullanımlara uygun küçük miktarlara bölünerek –20oC'nin altında (tercihen –70oC) 1 yıl kadar saklanabilir. Stok solüsyon kullanılacağı zaman oda ısısına getirilip, bekletilmeden kullanılır ve kalanı atılır.
- Antibiyotikler besiyerlerine eklenmeden önce stok konsantrasyonlardan çalışma konsantrasyonları hazırlanır ve besiyerlerine uygun miktarlarda eklenir.

Örnek:

1. 100mg EMB + 10ml steril distile su = 10 000µg/ml (stok solüsyon)
2. Vortex
3. Sterilizasyon (filtre ile)
4. 1ml stok solüsyon + 9ml steril distile su = 1 000µg/ml (çalışma solüsyonu)
5. Vortex
6. 1ml çalışma solüsyonu + 200ml besiyeri = 5.0µg/ml (final konsantrasyon)

İlaçların önerilen çözücüleri, stok konsantrasyonları, çalışma konsantrasyonları besiyerine eklenecek miktarlar ve besiyerlerindeki final konsantrasyonları Tablo 1'de yer almaktadır.

İlaçlı ve İlaçsız Agar Besiyerinin Hazırlanması:

- Besiyerleri genellikle her biri 200ml'lik olacak şekilde 8 balon içinde hazırlanır. Her bir 200ml'lik 7H10 agar besiyerinin hazırlanması için; bir cam balon içinde, 180 ml distile su içine 3.8gr dehidrate 7H10 agar besiyeri ve 1 ml gliserol eklenerek eritilir (üretici firmanın önerdiği şekilde).
- Otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilir.
- Daha sonra 50-56°C'lik su banyosunda soğumaya bırakılır.
- Besiyeri sıcaklığı 50-56°C'ye indiğinde içine zenginleştirici olarak 20 ml OADC (oleik asit, albumin, dekstroz ve katalaz karışımı) eklenir.

(Bu aşamaya kadar olan basamaklar 8 ayrı balon yerine tek bir 2lt'lik cam balonda gerçekleştirilip, daha sonra steril şartlarda 8 ayrı cam balona bölünebilir)

- 8 ayrı balondaki besiyerinden 6'sına her birine farklı bir ilaç veya farklı bir ilaç konsantrasyonu olacak şekilde, önceden hazırlanan SM, INH, RIF ve EMB solüsyonları tablo 1'de belirtilen miktarlarda eklenir. Diğer 2 besiyeri kontrol için ilaçsız besiyeri olarak kullanılır.
- Hazırlanan ilaçlı ve ilaçsız besiyerleri, önceden yazılmış-etiketlenmiş, 80 adet (40'arlık 2 set), dört bölmeli steril, plastik petri plaklarına, her bölmesine 5 ml (3-4mm kalınlığında) olacak şekilde, tablo 2'de belirtilen düzende dökülür. Besiyerleri dökülürken, balonlar tek tek su banyosundan alınıp iyice karıştırılmalı, agar katılaşmadan hemen plaklara paylaştırılmalı ve baloncukların oluşmamasına dikkat edilmelidir.
- Direkt ışıktan korunarak oda ısısında katılaşan besiyerleri, kullanımdan veya saklamadan önce yüzeyleri iyice kuruyuncaya kadar birkaç saat steril kabin içinde, kapakları hafif aralık bırakılmalıdır.
- Daha sonra kurumaya engel olmak için deliksiz plastik torbalara konularak ve ışıktan korunarak 4-80C'de 1 ay saklanabilir.
- Dökülen her parti besiyerinden birkaç tanesi (ideali %10) kontaminasyon kontrolü için 350C'de 48 saat inkübe edilmelidir.

İnokulum Hazırlanması:

<u>İndirekt yöntem:</u>

Agar proporsiyon yönteminde standart bir inokulumun hazırlanması önemli olduğundan indirekt yöntem tercih edilir. İnokulum kaynağı olarak genelde katı besiyerinde üremiş 4-5 haftalıktan daha eski olmayan koloniler kullanılır. Primer

izolasyon kültürleri subkültüre tercih edilir.

- Katı besiyerinde üremiş koloniler, tüm üremeyi temsil edecek şekilde bol miktarda ve besiyerinden almamaya da dikkat edilerek, bir öze veya spatula yardımı ile kazınarak alınır. İçinde 6–10 adet cam boncuk bulunan 3-5ml tween-albuminli sıvı besiyerinde (ör; %0.05 tween80 içeren Middlebrook 7H9) emulsifiye edilir.
- 1–2 dakika süreyle vortekslenir.
- Büyük partiküllerin çökmesi ve oluşan aerosollerin azalması için 20–30 dk süreyle tüp bekletilir.
- Süpernatant steril pastör pipeti yardımıyla boş bir steril cam tüpe alınır.
- Sıvı besiyeri ekleyerek süspansiyonun bulanıklığı McFarland no 1'e ayarlanır (yaklaşık 10^7 CFU/ml).
- Daha sonra steril distile suyla (veya serum fizyolojik) bu süspansiyonun 10^{-2} (1/100) ve 10^{-4} (1/10.000) dilüsyonları hazırlanır.

örnek: 0.1ml ana süspansiyon (McFar.1) + 9.9ml steril distile su = 10^{-2}; 0.1ml 10^{-2} süspansiyon + 9.9ml steril distile su = 10^{-4}

- Katı besiyerinde yeterli üreme yoksa alternatif bir yol olarak, alınan koloniler sıvı besiyerinde emulsifiye edildikten sonra inkübe edilerek bulanıklığın McFarland no 1'e ulaşması beklenilir ve buradan dilüsyonlar hazırlanır. İndirekt yöntemde inokulum kaynağı olarak katı besiyeri yerine sıvı primer izolasyon besiyeri kullanılacaksa, yine aynı şekilde dilüsyonlar hazırlanır.

Direkt yöntem:

Homojenize,dekontamine ve konsantre edilen hasta örneğinden hazırlanan yayma preparatta yaklaşık 20 mikroskop sahası incelendikten sonra görülen aside dirençli basil sayısına göre, örneğin steril distile su ile dilüsyonları hazırlanır (tablo 3). Daha sonra ki inokulasyon, inkübasyon ve değerlendirme aşamaları indirekt testtekine benzer. Hasta tedavi alan ve tedavi başarısızlığı söz konusu olan bir hasta ise, yayma sonuçlarını dikkate almaksızın mutlaka dilue edilmemiş hasta örneği de test edilir. Çünkü mikroskopide görülen basillerin tamamı kültürde üremeyecektir.

İnokulasyon ve İnkübasyon:

- Antibiyotik duyarlılığı test edilecek her bir mikroorganizma için; iki set test besiyeri (I ve II nolu plakların her birinden 2'şer) oda ısısına getirilir. Plak yüzeylerinin kuru olmasına dikkat edilir.
- Petri plakları hasta kültür numarası ve dilüsyon oranlarını gösterecek şekilde (setlerden birini 10^{-2} diğerini 10^{-4}) işaretlenir.
- Önce I nolu setin her bir bölmesine önceden hazırlanmış olan 10^{-2} basil dilüsyonundan steril bir pipet kullanarak 0.1'er ml inokule edilir (veya pastör pipeti kullanılarak her bölmeye 3'er damla damlatılır).
- Sonra II nolu set için aynı işlem 10^{-4} dilüsyon ile tekrarlanır.
- İnokulumun saf olup olmadığını kontrol etmek amacıyla dilue edilmemiş süspansiyondan 1–2 damla bir adet kanlı agar besiyerine de ekim yapılır.
- İnokulumun besiyerlerine absorbe olması için İnokule edilen plakları agarlı tarafı aşağıda olmak üzere oda ısısında yaklaşık 1 saat süreyle bekletilir (kapaklar hafif aralı şekilde steril kabin içinde bekletmek damlaların kurumasını kolaylaştırabilir). Bu işlem esnasında, formaldehit oluşumunu önlemek için, plaklar ışıktan korunmalıdır.
- Her bir petri plağı ayrı bir CO2 geçirgen polietilen torbaya yerleştirilir ve 36°C'de % 5-10 CO2'li ortamda inkübasyona bırakılır.

Plakların Okunması ve Yorumlama:

- İnkübasyonun ilk 7 günü kontaminant bakteri varlığı yönünden kanlı agar incelenir. Kontaminasyon saptanırsa, test tekrar edilir.
- Test besiyerlerinde ise antibiyotiksiz kontrol bölmeleri üç hafta boyunca her hafta incelenir. Üçüncü hafta sonunda üreme yetersizse, test tekrar edilmelidir.
- Üç haftadan önce kontrol bölmesinde 50 koloni üzerinde üreme (+1 veya daha fazla) görülürse test değerlendirilebilir ve dirençli sonuçlar rapor edilebilir. Fakat duyarlı sonuçları rapor etmek için üç hafta beklemek gerekir. Üçüncü haftadan sonra plaklar değerlendirilmemelidir. Dördüncü haftadan sonra beliren koloniler direnci göstermeyebilir.
- İnkübasyon sonunda tüm kadranlardaki koloniler sayılır ve tablo 4'e göre kantite edilir ve bir kayıt formuna kaydedilir. Mikroskopik inceleme ile görülebilen mikrokoloniler var ise, not edilir.

- Aşağıdaki formül ile direnç oranı hesaplanır.

$$\text{Direnç oranı}(\%) = \frac{\text{İlaçlı bölmedeki koloni sayısı X 100}}{\text{kontrol bölmesindeki koloni sayısı}}$$

- Direnç oranı≥%1 ise sonuç dirençli; <%1 ise duyarlı olarak yorumlanır.
- Kontrol kadranında sayılabilir düzeyde kolonisi olan ve 50'den fazla kolonisi olan dilüsyonun sonucunu yorumlanır ve karşılaştırma aynı dilüsyonlar arasında yapılmalıdır.
- Fakat 10^{-2} dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölmesinde sayılamayacak kadar koloni varsa (+3,+4) ve 10^{-4} dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölmesinde 50'den az koloni varsa, 10^{-4} dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölmesindeki koloni sayısı 100'le çarpılıp 10^{-2} dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölmesindeki koloni sayısı hesaplanabilir.
- Tüm kontrol bölmelerinde koloni sayımının 4+ olduğu dilüsyonlar dikkatle değerlendirilmelidir, bu durumda mikroorganizma tüm antibiyotiklere duyarlı ise, sonucu bildirilir, herhangi bir antibiyotiğe direnç söz konusu ise, yoğun bir inokulum kullanılmış olabilir, test tekrar edilir.

Kalite Kontrol:

Her yeni besiyeri ve her yeni antibiyotik solüsyonu hazırlandığında veya en azından haftada bir kez, tüm ilaçlara duyarlı olduğu bilinen M tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşu ve tüm ilaçlara dirençli olduğu bilinen bir laboratuvar suşu da test edilmelidir. H37Rv suşu test sonucunda tüm anti tüberküloz ilaçlara karşı duyarlı olmalıdır.

II. LÖWENSTEİN-JENSEN (LJ) BESİYERİNDE PROPORSİYON YÖNTEMİ

Prensip:

Proporsiyon yönteminin prensibini temel alan bu test NCCLS tarafından önerilmemekle birlikte, ekonomik olması nedeniyle DSÖ tarafından önerilen ve tüm dünyada halen yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması:

Antibiyotiklerin stok solüsyonlarının hazırlanması ve saklanması agar proporsiyon yönteminde anlatıldığı gibidir. Ancak antibiyotiklerin besiyerlerine eklenmeden

önce stok solüsyonlarından hazırlanan çalışma konsantrasyonları ve besiyerlerine eklenen miktarları farklıdır (tablo 5).

İlaçlı ve İlaçsız LJ Besiyerinin Hazırlanması:

Aşağıda 1600ml'lik Löwenstein-Jensen (L.J) besiyerinin hazırlanması örnek olarak verilmiştir. Besiyeri hazırlarken gerekli olan miktar hesap edilip ona göre hazırlık yapılmalıdır.

Tuz solusyonu:

Monopotasyum fosfat.....2400 mg
Magnezyum sulfat..... 240 mg
Magnezyum sitrat.....600 mg
L- Asparajin.....3600 mg
Gliserin.....12 ml
Saf su.....600 ml

- Tuz solüsyonu bir balona konulup su banyosunda eritilir.
- 115°C'de 20 dk steril edilir.
- 25 adet temiz, taze, iri boy yumurta sabunlu su ile iyice fırçalanarak temizlenir. Yumurtalar geniş bir kap içinde varsa U.V. lamba altında 45 dk steril edilir (veya 15 dk %70'lik etanolde bırakılır). Sonra büyükçe, ağzı kapatılabilen, steril bir balona steril huni yardımı ile kırılarak konur. Homojen oluncaya kadar kuvvetlice çalkalanır.
- Daha önce hazırlanmış ve steril edilmiş tuz solüsyonuna önce %2'lik malaşit yeşili 20-25ml ilave edilir.
- Daha sonra homojen edilmiş 1000 ml yumurta temiz steril bir tülbent veya gazlı bez ile tuz solüsyonu içine süzülür. Böylece ana LJ besiyeri elde edilmiş olur.
- Biri kritik konsantrasyon olmak üzere her bir ilaç için üç farklı konsantrasyonda ilaçlı besiyeri dökmek için (Ör: INH 0.1 + INH 0.2 + INH 1.0); üzerleri etiketlenmiş üç balon jojeye 500'er ml besiyeri paylaştırılır.
- Her birine tablo 5'de belirtilen miktarlarda ilacın çalışma konsantrasyonundan eklenir. Tüm ilaçlar için aynı işlem tekrarlanır.
- Ayrıca 1000ml'lik bir besiyeri ilaçsız kontrol besiyeri olarak bırakılır.
- Balonlar iyice çalkalanıp homojen olması sağlandıktan sonra üzeri etiketlenmiş, steril, vida kapaklı tüplere (16X160mm), her birine 5–7 ml olacak şekilde, aseptik şartlarda dağıtılır.

- Tüpler koagülatörde 78–80°C'de 1 saat (veya 85°C'de 45 dk) koagüle edilir.
- 18–24 saat 37°C'de sterilite kontrolü yapıldıktan sonra 2–8°C bir ay saklanabilir.

Not: Proporsiyon yönteminde direnc karar verirken kritik konsantrasyondaki üreme esas alınır. Diğer konsantrasyonlar direncin derecesini belirlemede kullanılır. İş yoğunluğunun yüksek olduğu durumlarda testi daha pratik hale getirmek için sadece kritik konsantrasyonlar test edilebilir (INH'ın yüksek konsantrasyonu da önerilmektedir). Tablo 5'de LJ besiyeri ile proporsiyon yönteminde kritik konsantrasyonlar ve önerilen diğer konsantrasyonlar görülmektedir..

İnokulum Hazırlanması:

İnokulum hazırlanması agar proporsiyon yönteminde anlatıldığı gibidir. Fakat indirekt yöntemde basil süspansiyonunun 10^{-3} ve 10^{-5} dilüsyonları önerilmektedir. Bu dilüsyonları hazırlamak için, McFarland no 1 bulanıklığındaki basil süspansiyonundan 1ml'si 9 ml steril distile suya eklenir, bu işlem seri dilüsyonlar şeklinde 5 kez tekrarlanır ve 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} dilüsyonlar elde edilir. Her bir dilüsyondan sonra tüp vortekslenmelidir. Sonra 10^{-3} ve 10^{-5} dilüsyonları inokulasyon için kullanılır.

İnokulasyon ve İnkübasyon:

- 10^{-3} (1/1000) ve 10^{-5} (1/100000) dilüsyonlardan, 2'şer adet ilaçsız kontrol besiyerine ve 1'er adet ilaçlı besiyerlerine 0.2ml ekilir. Ekimler steril, tüberkülin enjektörü, otomatik pipet veya pastör pipeti ile yapılabilir.
- Ekilen tüpler basillerin yüzeye yayılabilmesi için etüve yatık olarak konulur. İnokulumun buharlaşabilmesi için kapaklar hafifçe gevşek bırakılır.
- 24-48 saat sonra kapaklar sıkıca kapatılıp, 36±1°C'de inkubasyona bırakılır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Değerlendirme agar proporsiyon yönteminde anlatılana benzer şekildedir. Basil dilüsyonunda amaç sayılabilecek koloni elde etme esasına dayanır. İndirekt testlerde bu dilusyon 10^{-5} olabileceği gibi 10^{-3} de olabilir. Değerlendirmede değişik tüplerdeki koloniler sayılır, bu sayımlara göre dirençli basil oranı saptanır. Çıkan sonuçların her biri o ilaç için saptanmış olan kritik proporsiyon ile karşılaştırıp o ilaca karşı duyarlı ya da dirençli olduğuna karar verilir. LJ ile proporsiyon yönteminde farklı olarak bazı primer ve sekonder ilaçlarda kritik proporsiyon %1'değil %10 olarak belirlenmiştir (tablo 6).

DSÖ' sonuçların 28. ve 40. günlerde okunmasını önermiştir. DSÖ'nün bu rehberinde 28. günde dirençli koloni oranı KP'dan yüksek ise dirençli olarak rapor edilebileceğini; yine 28. günde kontrol besiyerinde yeterli üreme olmasına rağmen, en yoğun dilüsyon (10^{-3}) inokule edilmiş olan, ilacın en düşük konsantrasyonundaki besiyerinde üreyen koloni yok ise duyarlı olarak rapor edilebileceğini; bu iki durum dışındaki tüm sonuçların 40. günde değerlendirilmesi gerektiğini bildirmiştir.

III. BACTEC 460 TB (radyometrik) ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST YÖNTEMİ

Prensip: Mikobakteriler antibiyotik içeren ve içermeyen Bactec 12B (Middlebrook 7H12) şişelerine ekilir ve 37oC'de inkübe edilir. Kontrol şişesine ekilen mikroorganizma sayısı ilaç içeren şişeye göre 100 kat azdır. Şişeler günlük olarak Bactec 460 cihazında okunur. Antimikobakteriyel inhibisyon olmadığında, mikobakteriler ürer ve besiyerindeki 14C işaretli substratı kullanır. Böylelikle 14CO2 oluşur ve Bactec 460 cihazında Growth Index (GI) terimiyle kantitatif olarak ölçülür. Duyarlılık sonuçları, kontrol ve ilaç içeren şişelerin günlük GI değeri artışlarının karşılaştırılmasıyla yorumlanır. Antitüberküloz ilaç içeren besiyerinde, duyarlı mikobakterilerin üremesi inhibe olur ve bu GI okumalarıyla kaydedilen günlük 14CO2 üretiminde artmama veya azalmayla sonuçlanır. Mikobakteriler test edilen ilaca dirençliyse, üremenin inhibisyonu söz konusu olmayacak ve GI günlük olarak artacaktır. Günlük GI değerindeki artış, test kültürünün dirençlilik derecesiyle orantılıdır.

Tüberküloz basillerinin duyarlılık testi direkt veya indirekt yöntemle yapılabilir. Direkt testte, yayma pozitif işlenmiş hasta örneği direkt olarak antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine ekilir. İndirek testte ise, primer izolasyon besiyerinde üreyen mikroorganizmanın saf kültürü test edilir.

İNDİREKT DUYARLILIK TEST YÖNTEMİ

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:
Antibiyotikler (streptomisin, izoniazid, rifampin ve ethambutol) Bactec SIRE kiti olarak, liyofilize halde üretici firma tarafından sağlanmaktadır. Liyofilize halde bulunan bu ilaç şişeleri sulandırılarak stok solüsyonlar hazırlanılır.

• Liyofilize antibiyotik şişelerinin kapağını alkollü pamukla silin.
• Her liyofilize antibiyotik şişesine 5 ml steril distile deiyonize su ekleyin ve tamamen çözünene kadar karıştırın.
• Antimikrobiyal ajanların dilüsyon şeması ve Bactec 12B besiyerindeki son konsantrasyonları tablo 7'de görülmektedir.
• Stok solüsyonlar ufak miktarlar halinde 2-8°C'de 3 gün, -5 ila -20°C arasında 3 aya kadar, -70°C'de 6 aya kadar saklanabilir.

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz 12B şişelerinin hazırlanması:

• Her bir antibiyotik duyarlılık testi için beş adet Bactec12B şişesi ve bir adet Bactec dilüsyon sıvısı (DF) şişesi hazırlayın.
• Tüm şişelerin üzerine hasta kültür numarasını yazın.
• Beş adet 12B şişesinin birine kontrol, dördüne ise çalışılacak dört antibiyotiğin ismini yazın (S,I,R,E ve K)
• SM ve EMB'nin daha önce hazırlanmış olan stok solüsyonlarının 1ml'si aseptik şartlarda 2ml steril distile su içine ilave edilerek 1/3 dilüe edin.
• Her birinin üzerinde antibiyotiğin ismi yazan dört ayrı Bactec 12B şişesine, INH ve RIF için direkt stok solüsyondan, SM ve EMB için dilüe edilmiş stok solüsyondan 0.1ml.yi, tek kullanımlık tüberkülin enjektörüyle ekleyin. Her ilaç için ayrı bir enjektör kullanın.
• Kontrol şişesine herhangi bir antibiyotik eklemeyin.
• Hiçbir zaman 12B şişesine 0.1ml'den fazla miktarda antibiyotik solüsyonu eklemeyin. Daha yüksek konsantrasyonlarda çalışmak isterseniz antibiyotik stok solüsyonunu daha yüksek konsantrasyonda hazırlayabilirsiniz. Böylece 12B'ye ilave edeceğiniz miktar yine 0.1ml olarak kalmalıdır.
• Antibiyotik eklenen 12B şişesi 2-8°C'de saklanarak 7 gün içinde kullanılabilir.

İnokulum hazırlanması:

İndirekt duyarlılık test yönteminde, laboratuvarın kapasitesi ve çalışma şekline göre günlük (haftanın 7 günü) veya hafta içi (hafta sonu dahil olmayan) iki ayrı program vardır. Bu iki programda inokulasyon yoğunluğu, inkübasyon süresi ve şişelerin okutulmasında farklılıklar vardır.
İndirekt duyarlılık test yönteminde inokulum hazırlarken örnek olarak Bactec 12B besiyeri, diğer bir sıvı besiyerleri (MiddleBrook7H9 gibi) veya bir katı besiyerlerinde (LJ, M7H10 veya M7H11) üremiş saf kültürler kullanılabilmektedir.

Pozitif Bactec 12B şişesinden inokulum hazırlanması;

- Eğer primer izolasyon şişesi kullanılacaksa, GI değeri 10'un üzerine çıktığında şişeleri günlük olarak test ederek, GI değerinin >500 olmasını bekleyin ve bunu inokulum olarak kullanın veya GI 300 olunca bir gün daha inkübe edin ve inokulum olarak kullanın.
- Eğer 12B şişesine subkültür yapıldıysa, aynı şekilde GI değeri >500 olana kadar şişeleri günlük olarak okutun.
- GI değeri >800 ise, 1ml pozitif kültürü 1ml DF içine ekleyerek dilue edin ve bunu inokulum olarak kullanın.
- Eğer hafta sonu dahil olmayan program uygulanıyorsa, GI değeri 500'ü geçen şişeyi buzdolabında cumaya kadar saklayın (1 hafta içinde kullanın).

MiddleBrook 7H9 besiyerindeki üremeden inokulum hazırlanması;

Besiyerinin bulanıklığını DF ile hafta sonu dahil olmayan program için McFarland 0.5'e, günlük program için McFarland 1.0'e ayarlayın, inokulum olarak kullanın. (kültür 1–4 haftalık olmalıdır)

Katı besiyerindeki üremeden inokulum hazırlanması;

Üreme saptandıktan sonra 4 haftadan uzun süre geçmemiş kültürler kullanılmalıdır.

- Katı besiyerinde üremiş koloniler sert bir öze yardımıyla kazınarak alınır ve içinde 6–8 adet cam boncuk bulunan 3 ml DF'de emulsifiye edilir.
- 1–2 dakika süreyle vortekslenir.
- Büyük partiküllerin çökmesi için 30 dk süreyle tüp bekletilir.
- Süpernatant steril pastör pipeti yardımıyla boş bir steril cam tüpe alınır.
- Bu süspansiyonun üzerine DF ekleyerek bulanıklığını, hafta sonu dahil olmayan program için McFarland 0.5'e, günlük program için McFarland 1.0'e ayarlayın.

İnokulasyon ve inkübasyon;

- Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılacak tüm 12B şişelerini Bactec 460 cihazında test ederek şişelerin içinde % 5'lik CO2 ortamı sağlayın.
- Dört adet antibiyotikli, bir adet antibiyotiksiz kontrol besiyerini ve bir adet Bactec DF şişesini sıralayın.
- Şişelerin lastik kapaklarını alkollü pamukla silerek dezenfekte edin.
- İnokulum süspansiyonunu iyice karıştırın ve bir tüberkülin enjektörü ile ilaç içeren dört adet 12B şişesine 0.1ml inokule edin.

- Ayrıca yine 0.1ml bu süspansiyondan 9.9ml DF şişesine ekleyin ve karıştırın. Böylece standardize edilmiş inokulum süspansiyonunu DF ile 1/100 oranında dilue edin.
- DF ile 1/100 oranında dilue edilmiş süspansiyondan 0.1ml'yi kontrol şişesine inokule edin.
- Birkaç damla inokulum süspansiyonunu, bir adet kanlı agar ve bir adet M7H10 veya M7H11 agar plağına subkültüre edin.
- Her şişenin lastik kapağını dezenfektan emdirilmiş pamukla ve peşinden alkollü pamukla silin
- Şişeleri 37±1°C'de karanlıkta inkübe edin.

Sonuçların okunması:

Sonuçları okumadan önce kanlı agar ve M7H10 veya M7H11 plaklarını kontaminasyon yönünden inceleyin. Kontaminasyon saptanmaz ise günlük ya da hafta sonu dahil olmayan programa göre sonuçları okuyup, sonuçları kayıt formuna işleyin.

Günlük programda;

- Şişeleri hafta sonu ve tatiller dahil olmak üzere günlük olarak okutun.
- Her gün yaklaşık olarak aynı saatte (±2 saat) okutun.
- En az 4 gün okutun.
- Kontrol şişesinin GI değeri >30 ise sonuçlar yorumlanabilir.
- Kontrol şişesinin GI değeri bir iki gün içinde >30 olursa, muhtemelen inokulum çok yoğundur. Testi tekrar edin.
- Kontrol şişesinin GI değeri 3. okutmada >30 olursa, sonuçları yorumlamadan önce bir gün daha inkübe edin.
- Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 30'a ulaşmazsa, testi tekrar edin.

Hafta sonu dahil olmayan programda;

- Testi Cuma günü yapın.
- Pazartesinden itibaren günlük ve yaklaşık olarak her gün aynı saatte (±2 saat) okutun
- En az 3 gün okutun.
- Kontrol şişesinin GI değeri Pazartesi günü >30 olursa, muhtemelen inokulum çok yoğundur. Testi tekrar edin.

- Salı günü kontrol şişesinin GI değeri >30 olursa, çarşamba günü de okuttuktan sonra, sonuçları yorumlayın. Pazartesi gününe ait GI değerini dikkate almayın.
- Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 30'a ulaşmazsa, testi tekrar edin.

Yorumlama:

- Kontrol ve ilaç içeren şişelerin, bir gün önceyle karşılaştırarak, günlük GI farklılıklarını (ΔGI) hesap edin.
- Sonuçları aşağıdaki gibi yorumlayın;
  Kontrol şişesinin ΔGI > ilaçlı şişenin ΔGI = duyarlı
  Kontrol şişesinin ΔGI < ilaçlı şişenin ΔGI = dirençli
  Kontrol şişesinin ΔGI ≈ ilaçlı şişenin ΔGI = sınırda veya kısmi dirençli
- İlaç içeren şişenin GI değeri 500'ü geçer ve bir sonraki gün de 500'ün üzerinde kalırsa, ΔGI'e bakmaksızın, sonucu dirençli olarak yorumlayın (kontrol şişesinden inokulumun yoğun olmadığını kontrol ederek inokulumun yoğun olmadığından veya bir kontaminasyon olmadığından emin olun).
- Sınırda sonuçlar söz konusuysa, şişeleri ek olarak 2–3 gün daha okutun. Bu ek okumalar duyarlı veya dirençli yönünde bir trendin yakalanmasına neden olacaktır.

Kalite kontrol;

Her antibiyotik duyarlılık test gününde M.tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşunu da test edin. Bu suş test sonucunda tüm primer ve sekonder antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlı olmalıdır. M.tuberculosis H37Rv içeren kontrol şişesi 3–5 gün içinde 30'dan büyük bir GI değerine ulaşmalıdır. Kalite kontrol suşunun sonuçları uygun değilse, aşağıdaki parametreleri gözden geçirin.
Kontrol şişesinin GI 30 değerine ulaşmasında gecikme varsa;

- İnkübasyon ısısının 37±1°C olduğundan,
- Suşun canlılığından,
- İnokulum dilüsyonunun doğru yapıldığından emin olun.

M.tuberculosis H37Rv her hangi bir ilaca dirençli bulunursa;

- Tam dirençliyse, besiyerinde antibiyotik olmayabilir veya kontamine olmuş olabilir.
- Kısmi dirençliyse, antibiyotik aktivitesini kaybetmiş olabilir veya inokulum çok yoğun olabilir.

DİREKT DUYARLILIK TEST YÖNTEMİ :

ARB yayma pozitif tüm hasta örneklerine uygulanabilir. Hasta örneğindeki basil sayısına bağlı olarak 4–21 gün içinde sonuç verir. Primer izolasyon besiyeriyle aynı gün ekim yapılır. Tüm direkt test sonuçları indirekt testle doğrulanmalıdır.

- Sadece izoniazid, rifampin, streptomisin ve ethambutolü test edin.
- İnokulasyon öncesi kontrol ve antibiyotik içeren şişelere 0.1ml Bactec PANTA (Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim ve Azlosilin) antibiyotik karışımı ekleyin.
- Homojenize, dekontamine ve konsantre edilmiş, ARB'si pozitif, iyice karıştırılmış primer hasta örneğinin 0.1ml.sini antibiyotik içeren dört adet 12B şişesine direkt olarak inokule edin.
- Ayrıca hasta örneğini DF sıvısıyla 1:10 dilue edip iyice karıştırdıktan sonra, 0.1ml kontrol şişesine inokule edin. (genellikle örnek az sayıda basil içerdiğinden inokulumun 1/100 yerine 1/10 dilüsyonu tercih edilir)
- Her 2–3 günde bir okutarak, 37±1°C'de üç haftaya kadar inkübe edin (yayma pozitifliği yüksek düzeyde olan örnekleri her gün okutun).
- Kontrol şişesinin GI değeri > 10 olduğunda, şişeleri her gün okutun
- Kontrol şişesinin GI değeri > 20 olduğunda, sonuçları yorumlayın.
- Kontrol şişesinin GI değeri 21 günlük inkübasyonla >20 olmaz ise, testi yorumlamayın.
- İnokulumdaki mikobakteri sayısı daha az ve inkübasyon süresi daha uzun olduğundan genellikle sonuçlar daha bariz olarak duyarlı veya dirençlidir. İlaçlı şişedeki GI'in, kontrol şişesindeki GI'e yakın olması (%20 içinde), kontrol 1/10 dilüe edilmiş olduğundan, %10 dirençli populasyonu düşündürür.
- Rapora "sonuçlar, direk hasta örneğinin test edilmesiyle elde edilmiştir" şeklinde bir not koyun.
- İzolatın tüberküloz basili olduğu doğrulanmadan, duyarlılık test sonuçlarını rapor etmeyin.
- Kalite kontrol için, indirekt testte belirtilenler direkt testte de geçerlidir.

BACTEC 460 PZA (PİRAZİNAMİD) DUYARLILIK TESTİ

Pirazinamid (PZA), tüberküloz basillerine karşı sadece düşük pH'da aktif olan bir antimikrobiyal ajandır. Bactec PZA yönteminde, test pH 6.0'da yapılır.

PZA solüsyonunun hazırlanması:

- Bactec Liyofilize PZA, 5 ml Bactec Reconstituting Fluid (RF) ile sulandırılır (4.000 µg/ml).
- PZA stok solüsyonu ufak miktarlara bölünüp, SİRE stok solüsyonları gibi saklanabilir.

PZA içeren besiyerinin ve kontrol besiyerinin hazırlanması:

• Bactec PZA duyarlılık test besiyerine, RF ile sulandırılmış olan PZA solüsyonundan tüberkülin enjektörü ile 0.1ml, eklenir (pH 6.0) (final PZA konsantrasyonu 100 µg/ml).

• Kontrol besiyerine Bactec RF sıvısından 0.1ml eklenir. (RF üremeyi kolaylaştırıcı bir madde olan POES (polyoxyethylene sterearate) içerir, bu nedenle inokule edilecek tüm şişelerde bu RF bulunmalıdır.

İnokulum hazırlanması:

• Aşağıda belirtilen besiyerlerinden herhangi birindeki üremeden 0.1ml'yi, 0.1ml Bactec RF eklenmiş Bactec 12B besiyerine subkültüre edin.

- GI değeri 300-999 arası olan Bactec 12B besiyeri
- Bulanıklığı McFarland no1 veya daha düşük olan M7H9 besiyeri
- Katı besiyerinden hazırlanmış ve bulanıklığı McFarland no1'e yakın süspansiyon

• Karanlıkta 37±1°C'de inkübe edin.

• Subkültürü günlük olarak okutun.

- GI 300-500 arasında ise, bunu inokulum olarak kullanın.
- GI>500 ise aşağıdaki gibi dilue edin.

a) GI 500-599 ise, 1.0ml 12B besiyeri ekleyin.
b) GI 600-699 ise, 1.5ml 12B besiyeri ekleyin.
c) GI 700-799 ise, 2.0ml 12B besiyeri ekleyin.
d) GI 800-899 ise, 2.5ml 12B besiyeri ekleyin.
e) GI 900-999 ise, 3.5ml 12B besiyeri ekleyin.

- Pik GI değerine ulaştıktan sonra veya GI 999 okunduktan sonra 1 günden fazla geçen kültürleri inokulum olarak kullanmayın.

İnokulasyon ve inkübasyon:

• Tüm şişelerin lastik kapağını %70'lik alkolle silin.

• İnokulum süspansiyonunu iyice karıştırın ve bir tüberkülin enjektörü ile PZA içeren şişeye ve kontrol şişesine 0.1ml inokule edin. Kontrol şişesi için inokulumu dilüe etmeyin.

• Birkaç damla inokulum süspansiyonunu bir adet kanlı agar ve bir adet M7H10 veya M7H11 agara, inokulumun saf olup olmadığını kontrol etmek için, inokule edin.

- 37±1°C'de karanlıkta inkübe edin.

Sonuçların okunması:

- Kanlı agar ve M7H10 veya M7H11 plaklarını kontaminasyon yönünden inceleyin.
- Şişeleri günlük olarak okutun.
- Her gün yaklaşık olarak aynı saatte (±2 saat) okutun.
- En az 4 gün okutun.
- Kontrol şişesinin GI değeri ≥ 200 ise, sonuçlar yorumlanabilir.
- Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 200'e ulaşmazsa, testi yorumlamayın.

Not: Hafta sonu dahil olmayan program kullanılacaksa SİRE için kullanılan programa benzer şekilde test Cuma günü yapılır, pazartesi gününden itibaren okutulmaya başlanılır.

Yorumlama:

Sonuçları aşağıdaki gibi yorumlayın;

- PZA şişesinin GI < kontrol şişesinin GI'inin % 10 = duyarlı
- PZA şişesinin GI > kontrol şişesinin GI'inin % 10 = dirençli

Direnci gösteren sonuçlar 4 günden önce yorumlanabilir, fakat duyarlılığı gösteren sonuçlar 4 günden önce raporlanmamalıdır.

Kalite kontrol:

M.tuberculosis H37Rv suşunun üreme kontrolü 3–8 gün içinde GI > 30 değerine ulaşmalıdır ve PZA'ya tamamen duyarlı olmalıdır.

IV. BACTEC MGIT 960 SİSTEMİ İLE DUYARLILIK TESTİ

Prensip:

BACTEC MGIT 960 SIRE kiti kültürde izole edilen M.tuberculosis'i test etmek için nonradyometrik bir duyarlılık testidir. BBL MGIT 7-ml mycobacteria growth indicator tube (MGIT tube) mikobakterilerin üremesini ve saptanmasını sağlayan modifiye Middlebrook 7H9 broth içerir. MGIT tüpün dibindeki silikon içine floresan madde gömülüdür. Floresan madde sıvı besiyerinde çözülmüş oksijen varlığına

duyarlıdır. Çözülmüş oksijenin başlangıçtaki konsantrasyonu floresan maddeden floresans yayılımını baskılar. Üreyen mikroorganizmalar oksijeni tüketir ve floresan maddenin floresans yaymasına neden olur.

BACTEC MGIT 960 SIRE kiti 4–13 günde sonlanan kalitatif bir testtir. Test M.tuberculosis izolatlarının ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki üremelerinin karşılaştırılması esasına dayanır. MGIT 960 cihazı tüplerdeki floresans artışını sürekli izler. Cihaz yardımıyla ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki floresans analizleri karşılaştırılarak duyarlılık sonuçları belirlenir. BACTEC MGIT 960 cihazı otomatik olarak bu sonuçları yorumlar ve duyarlı ya da dirençli olarak bildirir.

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

Antibiyotikler (streptomisin, izoniazid, rifampin ve ethambutol) Bactec MGIT SIRE kiti içinde liyofilize halde üretici firma tarafından sağlanmaktadır. Liyofilize halde bulunan bu ilaç şişeleri sulandırılarak stok solüsyonlar hazırlanılır.

- Liyofilize antibiyotik şişelerinin kapağını alkollü pamukla silin.
- Her liyofilize antibiyotik şişesine 4 ml steril distile su ekleyin ve tamamen çözünene kadar karıştırın.
- Liyofilize antibiyotiklerin dilüsyon şeması ve BBL MGIT 7ml besiyerindeki final konsantrasyonları tablo 8'de görülmektedir.
- Özellikle INH için olmak üzere, eğer bir ilacın kritik konsantrasyonunda direnç görülürse, ilacın daha yüksek bir konsantrasyonu için duyarlılık testi yapılması önerilmektedir. Bu amaçla BACTEC MGIT SM 4.0 ve INH 0.4 kitleri mevcuttur. Bu konsantrasyonlarda da duyarlılık testi yapılacaksa; bu iki kitteki liyofilize ilaçlar 2ml steril distile su ile sulandırılmalıdır tablo 8. Diğer prosedür SIRE kiti ile benzerdir.

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz MGIT tüplerinin hazırlanması:

- Her test izolatı için 5 tane MGIT tüpünü alın ve üzerlerini yazın (birine GC (Kontrol), diğerlerine S, I, R ve E olarak). Tüpleri uygun büyüklükte AST (antibiyotik duyarlılık testi) set taşıyıcısına doğru sırayla yerleştirin (soldan ilk tüp GC, sonra SIRE).
- Her tüpe aseptik şartlarda 0.8ml BACTEC MGIT SIRE suplementi ekleyin. Kitin içinden çıkan suplementin kullanılması önemlidir.

• Dört SIRE tüpünün her birine, üzerine yazdığımız antibiyotik adına uygun şekilde, daha önce hazırladığımız antibiyotik solüsyonlarından bir mikropipet yardımı 100µl pipetleyin (tablo 8).
• Kontrol (GC) tüpüne hiçbir antimikrobiyal ajan eklemeyin.

İnokulum hazırlanma:

MGIT yöntemi ile duyarlılık testleri M.tuberculosis'in saf kültürlerinden yapılır

Katı besiyerinden İnokulum hazırlanması;

• Cam boncuklu steril bir tüpe 4 ml Middlebrook 7H9 veya MGIT broth koyun.
• Steril bir öze ile olabildiğince çok koloniyi kazıyarak alın ve 7H9 içinde süspanse edin.
• Büyük kümeleri dağıtmak için süspansiyonu 2–3 dakika vorteksleyin. Süspansiyon bulanıklılığı McFarland no1 standardını geçmelidir.
• Süspansiyonu 20 dakika bekletin.
• Süpernatantı başka bir kapaklı steril tüpe aktarın, 15 dk. daha bekletin.
• Süpernatantı yine başka bir kapaklı steril tüpe aktarın ve süspansiyonu McFarland no:0.5 standardına göre ayarlayın.
• Ayarlanmış süspansiyonun 1 ml'sini 4 ml steril serum fizyolojikte dilüe edin (1/5 dilüsyon)

Pozitif MGIT tüpünden inokulum hazırlanması;

• Pozitif bir MGIT tüpü, MGIT 960 cihazında pozitif olduktan sonraki gün (1.gün) dahil 5. güne kadar kullanılabilir.
• Tüpün 5 günden daha fazla bir pozitifliği varsa, Growth suplement eklenmiş yeni bir MGIT tüpüne subkültürü yapılmalı ve pozitif oluncaya kadar cihazda test edilmeli, pozitifliği takip eden 1–5. günlerde kullanılmalıdır.
• Tüpler 1–2 gündür pozitifse iyice karıştırılıp, inokulum olarak kullanılır.
• Tüpler 3–5 gündür pozitifse iyice karıştırılır, 1ml'si 4ml SF'de dilüe edilir ve bu 1/5 dilüe süspansiyon inokulum olarak kullanılır.

İnokülasyon:

• Dört adet ilaçlı MGIT tüpünün her birine (S,I,R,E) inokulum süspansiyonundan 0.5ml pipetleyin.
• 1/100'lük kontrol süspansiyonu hazırlamak için 9.9ml steril SF içine 0.1ml organizma süspansiyonu pipetleyin ve iyice karıştırın.

• 1/100'lük kontrol süspansiyonundan "GC" olarak etiketlenmiş MGIT tüpüne 0.5ml pipetleyin.
• Tüm tüpleri sıkıca kapatın. 3–4 kez hafifçe alt üst ederek karıştırın.
• MGIT 960 cihazına giriş kaydını yapın (BACTEC MGIT 960 cihazı kullanım kılavuzuna göre)
• İnokulum süspansiyonundan kanlı agara 0.1ml ekin, 35-37 oC'de inkübe edin.
• Bakteriyel kontaminasyon açısından kanlı agar plağını 48. saatte kontrol edin. Kanlı agar plağında üreme yoksa teste devam edin, üreme varsa AST (Antibiyotik Duyarlılık Testi) setini atın ve testi tekrar edin.

Sonuçların yorumlanması ve rapor edilmesi:
• İlaçlı tüpteki floresans kontrol tüpündekinden daha az olduğunda, MGIT 960 cihazı sonucu duyarlı olarak yorumlar.
• İlaçlı tüpteki floresans kontrol tüpündekine eşit olduğunda, cihaz sonucu dirençli olarak yorumlar.
• MGIT 960 cihazının yorumu esas alınarak sonuç "duyarlı" veya "dirençli" olarak rapor edilir.
• Test sonucunun etkilenebileceği bazı durumlar olduğunda, duyarlılık yorumu olmaksızın cihaz sonucu hata (X) olarak verir. Bu durumda sonuç rapor edilmez.
• Raporda test yöntemi, ilaç ve konsantrasyonlar bulunmalıdır.

Uyarılar:
• BACTEC MGIT 960 duyarlılık testi test edilen izolatın duyarlılık derecesini yorumlamaz. Sonuçlar test edilen ilaç ve konsantrasyon için S (duyarlı) ya da R (dirençli) olarak rapor edilir.
• STR, INH, RIF, EMB için BACTEC MGIT 960 SIRE testinde kullanılan kritik konsantrasyonlar, yanlış duyarlı sonuçlardan kaçınmak için, proporsiyon yönteminde kullanılan konsantrasyonlardan biraz daha düşüktür. Önerildiği gibi daha yüksek konsantrasyonlarda da test etmek izolatın düşük düzey direncini saptama olasılığını artıracaktır.
• BACTEC MGIT 960 duyarlılık testi sadece BACTEC MGIT 960 cihazı ile uygulanabilir. AST seti manuel olarak okunamamaktadır. M.tuberculosis'in sadece saf kültürü kullanılmalıdır. Kontamine olan veya çok sayıda mikobakteri

türü içeren kültürler yanlış sonuçlar verebilir ve test edilmemelidir. Klinik örneklerden direkt test önerilmemektedir. Katı besiyerinden yapılan süspansiyonlar standardize edilmeden çöktürmek için bekletilmelidir. Katı besiyerinden hazırlanan inokulum görsel olarak McFarland no: 0.5 bulanıklık standartına ayarlanmalıdır; bu yapılmadığında yanlış sonuçlar alınabilir veya cihaz hata verebilir.

- İlaçlı tüplere ve kontrol tüpüne inokule edilen organizma süspansiyonunun yukarıda önerilen dilüsyonları kullanılmadığında yanlış sonuçlar verebilir.
- İlaçların uygun volümde steril distile su ile sulandırılmaması yanlış sonuçlar verebilir.
- İnokule edilen tüplerin iyice karıştırılması önemlidir. Tüplerin yeterince karıştırılmaması yanlış dirençli sonuçlara yol açabilir.
- AST set rakına AST setinin doğru sıra ile konulmaması hatalı sonuçlar verebilir. İlaç tanımına uygun AST set rakının seçilmemesi geçersiz veya yanlış sonuçlarla sonuçlanabilir.
- AST setinin cihaz içine doğru şekilde yerleştirilmemesi bir isimsiz durum olarak sonuçlanacaktır, 8 saat içinde sorun çözülmelidir. Sorun 8 saatde çözülmez ise, AST seti atılmalı ve test tekrar edilmelidir.

AST setinde SIRE suplementi kullanılmaması yanlış sonuçlar verebilir. AST setine BACTEC MGIT 960 growth suplementi eklemeyin.

Kalite kontrol:

- MGIT 960 SIRE kit şişelerinin gelen her yeni parti veya lot numarasında, M.tuberculosis ATCC 27294 kalite kontrol (QC) suşları test edilmelidir. Ayrıca duyarlılık testi yapılacağı her hafta aynı kalite kontrol suşları çalışılmalıdır.
- Kalite kontrol stok suşları -70oC'de saklanır.
- Kalite kontrol testi, test edilecek ilaç kitleri için "duyarlılık test prosedürü" açıklamalarına uyularak uygulanmalıdır.
- 4–13 gün içinde kalite kontrol suşu GC tüpünde pozitif sonuç vermeli ve tüm antibiyotiklere duyarlı olmalıdır. Uygun sonuçlar alınmaz ise test tekrar edilir.

BACTEC MGIT 960 PZA (PİRAZİNAMİD) DUYARLILIK TESTİ

Prensip:

BACTEC MGIT 960 PZA kiti de SIRE kiti ile benzer prensiple çalışan, pirazinamid (PZA) duyarlığını 4–21 günde test eden kalitatif bir testtir. PZA testi genel

yöntemlerin modifikasyonunu gerektirir, çünkü PZA in vitro sadece daha düşük pH değerlerinde aktiftir. MGIT 960 PZA besiyeri, pH'ı 5.9'a düşürülmüş modifiye Middlebrook 7H9 broth içerir.

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:
BACTEC MGIT 960 PZA kiti içinden çıkan liyofilize PZA, daha önce anlatılan MGIT SIRE duyarlılık testindeki gibi sulandırılır. Tek fark sulandırım için 2.5ml distile su kullanılmasıdır (tablo 8).

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz MGIT tüplerinin hazırlanması:

- Her test izolatı için 2 tane BACTEC MGIT PZA tüpünün üzerini "GC" ve "PZA" olarak yazın. Tüpleri iki tüplük AST taşıyıcısına doğru sırayla yerleştirin (firma önerilerine göre).
- Her tüpe aseptik şartlarda 0.8ml BACTEC MGIT PZA suplementi ekle. Doğru suplementin kullanılması önemlidir.
- Bir mikropipet kullanarak, aseptik şartlarda, etiketine uygun MGIT tüpüne (PZA) 8.000µg/ml'lik MGIT PZA'dan 100µl pipetleyin.
- Kontrol tüpüne antimikrobiyal ajan eklemeyin.

İnokulum hazırlanması:
MGIT SIRE duyarlılık testinde anlatıldığı gibidir.

İnokülasyon:
İlaçlı tüplerin inokülasyonu MGIT SIRE duyarlılık testinde anlatıldığı gibidir. Fakat kontrol tüpü için 1/100'lük değil 1/10'luk kontrol süspansiyonu hazırlayın. 1/10'luk kontrol süspansiyonu hazırlamak için 4.5ml steril SF içine 0.5ml inokulum süspansiyonu pipetleyin, iyice karıştırın. "GC" olarak etiketlenmiş tüpe 1/10'lük kontrol süspansiyonundan 0.5ml pipetleyin.
Taşıyıcıda kontrol tüpünün pozisyonunun soldan ilk tüp olduğundan emin olun. AST setinin cihaza girişini yaparken, iki tüplük AST set tanımında ilaç olarak PZA'yı seçin.

Sonuçların yorumlanması ve rapor edilmesi:
SİRE yorumunun %1 proporsiyon düzeyinde yapıldığı gibi, PZA'da direnç %10 proporsiyon düzeyinde rapor edilir.

Sadece PZA'ya direnç (Monoresistance) nadirdir. Sadece PZA direnci bulunmuş ise, M.tuberculosis'in saflığını, identifikasyonunu ve diğer parametreleri kontrol ederek sonuçları doğrulayın.

Uyarılar:

- PZA duyarlılık testinde NCCLS, referans yöntem olarak BACTEC 460TB yöntemini önermektedir. Nonradyometrik BACTEC MGIT 960 PZA kiti, BACTEC 460TB yöntemi ile yaklaşık aynı sürede duyarlılık sonucu vermektedir. Benzer sonuçlar elde edebilmek için MGIT 960 PZA kitinde, BACTEC 460TB'de olduğu gibi PZA'nın 100g/ml konsantrasyonu kullanılmaktadır.
- Katı besiyerindeki üreme taze olmalıdır (14 günlük). Daha eski kültürlerden hazırlanan; McFarland no 0.5 standardı kullanılmadan hazırlanan; uygun dilüsyonlarda hazırlanmayan inokulumlar yanlış sonuçlar verebilir.
- Kontrol tüpüne inokulasyon için izolatın 1/10 dilüsyonunun kullanılmaması yanlış sonuçlar verebilir.
- PZA AST setinde MGIT 960 PZA suplementi kullanılmaması yanlış sonuçlar verebilir. PZA AST setine MGIT 960 SIRE suplementi veya BACTEC MGIT 960 growth suplement koymayın.

KAYNAKLAR

1. Hacek D: Modified proportion agar dilution test for slowly growing mycobacteria. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg HD (Ed in Chief). ASM, Washington, D.C. 1992: 5.13.1–5.13.15.
2. NCCLS. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standart. NCCLS document M24-A, Pennsylvania, 2003.
3. Kent PT, Kubika GP. Public Health Mycobacteriology A Guide for the level III Laboratory-Diivision of laboratory training and consultation laboratory program office. Public Health Service-Centers for Disease Control, Atlanta 1985: 159-182.
4. Gümüşlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz laboratuvar rehberi.1.Baskı. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı. 1998.
5. WHO. Guidelines for drug susceptibility testing for second-line anti-tuberculosis drugs for DOTS-PLUS. WHO/CDS/TB/2001.288; World Health Organization, 2001.
6. Siddiqi SH. Radiometric (Bactec) tests for slowly growing mycobacteria. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg HD (Ed in Chief). American Society

for Microbiology/Washington,D.C. 1992: 5.14.1–5.14.25.

7. Siddiqi SH. BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson and Company Maryland,USA, 1996.

8. NCCLS: Antimycobacterial susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis; tentative standart. NCCLS document M24-T, vol 15, no 16, 1995.

9. Della-Latta P. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. İn Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg HD (Ed in Chief), Second edition, ASM, Washington, D.C. 2004: 7.7.1–7.8.5.

Tablo 1. Middlebrook 7H10 Agar besiyerine eklenmek üzere hazırlanan ilk seçenek ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları, besiyerine eklenen miktarları ve besiyeri içindeki final konsantrasyonları

İlaç	Çözücü	Stok konsantrasyon (µg/ml)	7H10 agar için çalışma konsantrasyonu (µg/ml)	200ml 7H10 agara çalışma konsantrasyonundan eklenen miktar (ml)	7H10 agarda ilacın son konsantrasyonu (µg/ml)
INH	SDW	10.000	200	0.2	**0.2**[KK]
				1.0	1.0
EMB	SDW	10.000	1.000	1.0	**5.0**[KK]
RIF	DMSO (veya metanol)	10.000	1.000	0.2	**1.0**[KK]
SM	SDW	10.000	1.000	0.4	**2.0**[KK]
				2.0	10.0

SDW= Steril Distile Su; DMSO=Dimetil sulfoksit; KK=kritik konsantrasyon

Tablo 2. Middlebrook 7H10 Agar ile agar proporsiyon yönteminde ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerinin dört bölmeli petri plaklarına dökülme düzeni ve ilaçların konsantrasyonları.

Plak	Bölme	Antimikrobiyal ilaç
I	I	İlaçsız (kontrol)
	II	İzoniazid (0.2 _g/ml)
	III	Streptomisin (2 _g/ml)
	IV	Rifampisin (1 _g/ml)
2	I	İlaçsız (kontrol)
	II	İzoniazid (1.0 _g/ml)
	III	Streptomisin (10 _g/ml)
	IV	Ethambutol (5 _g/ml)

Tablo 3. Direkt test yönteminde inokulum dilüsyonu

EZN boyama (ARB/alan) (X1000 büyütme)	Florokrom boyama (ARB/alan) (X200-400 büyütme)	Dilüsyonlar
<1	<25	Dilüsyon Ø
1-2	25-50	Dilüsyon Ø, 10^{-1}
2-10	50-250	Dilüsyon Ø, 10^{-2}
>10	>250	10^{-2}, 10^{-3}

(NCCLS document M24-A'ya gore)

Tablo 4. Agar plaklarındaki mikobakteri kolonilerinin üreme yönünden kantitasyonu

Koloni sayısı	Kantitasyon
0 - 50	gerçek koloni sayısı
50 - 100	1+
100 - 200	2+
200 - 500	3+
>500 (Aşırı üreme)	4+

Tablo 5. Proporsiyon yönteminde LJ besiyerine eklenmek üzere hazırlanan ilk seçenek ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları, besiyerine eklenen miktarları ve besiyeri içindeki final konsantrasyonları

İlaç	Çözücü	Stok konsantrasyon (µg/ml)	LJ için çalışma konsantrasyonu (µg/ml)	500ml LJ'ye eklenen miktar (ml)	LJ'de ilacın son konsantrasyonu (µg/ml)
INH	SDW	10.000	100	0.5	0.1
				1.0	**0.2[KK]**
				5.0	1.0
EMB	SDW	10.000	1.000	0.5	1.0
				1.0	**2.0[KK]**
				2.0	4.0
RIF	Metanol	10.000	10.000	0.5	10.0
				1.0	20.0
				2.0	**40.0[KK]**
SM	SDW	10.000	1.000	1.0	2.0
				2.0	**4.0[KK]**
				4.0	8.0

SDW= Steril Distile Su; KK=kritik konsantrasyon

Tablo 6. Proprosiyon yönteminde Middlebrook 7H10 agar için ve LJ için önerilen Kritik Konsantrasyon (KK) ve Kritik Proporsiyonlar (KP).

Antitüberküloz ilaç	7H10		LJ		Antitüberküloz ilaç	7H10		LJ	
	KK (µg/ml)	KP (%)	KK (µg/ml)	KP (%)		KK (µg/ml)	KP (%)	KK (µg/ml)	KP (%)
Izoniazid (INH)	0.2	1	0.2	1	Amikasin (AMK)	4.0	1		
Rifampin (RIF)	1.0	1	40	1	Kapreomisin(KAP)	10.0	1	40	1
Streptomisin (SM)	2.0	1	4.0	10	Kanamisin (KAN)	5.0	1	20	10
Ethambutol (EMB)	5.0	1	2.0	1	Etyonamid (ETH)	5.0	1	20	10
Pirazinamid (PZA)*	25-50	1	100.0	10	Klofazimin (CLF)	1.0	1		
					Sikloserin (CYC)	30.0	1	30	10
					Ofloksasin (OFL)	2.0	1	2	1
					PAS	2.0	1	0.5	1

*PZA'nın Bactec 12B besiyerinde pH 6'da test edilmesi önerilir.

Tablo 7: Bactec 460TB duyarlılık testinde liyofilize antibiyotiklerden stok solüsyon hazırlama ve 12B besiyerindeki final antibiyotik konsantrasyonları.

Antibiyotik	şişedeki liyofilize miktar	Sulandırım için steril distile su	Sulandırım sonrası konsantrasyon	12B'ye aktarılan miktar	12B'deki final konsantrasyon
Streptomisin	1.2 mg	5 ml, sonra 1:3 dilüsyon	80 µg/ml	0.1 ml	2.0 µg/ml
İzoniazid	0.02 mg	5 ml	4 µg/ml	0.1 ml	0.1 µg/ml
Rifampin	0.4 mg	5 ml	80 µg/ml	0.1 ml	2.0 µg/ml
Ethambutol	1.5 mg	5 ml, sonra 1:3 dilüsyon	100 µg/ml	0.1 ml	2.5 µg/ml

Tablo 8: MGIT liyofilize antibiyotiklerinin dilüsyon şeması ve 7ml'lik MGIT tüpteki final konsantrasyonları

Liyofilize antibiyotik	Sulandırım (Steril distile su)	Sulandırıldıktan sonraki ilaç konsantrasyonu (µg/ml)	MGIT tüpe eklenen miktar (µl)	MGIT tüpteki final konsantrasyon (µg/ml)
MGIT SM	4ml	83	100	1.0
MGIT INH	4ml	8.3	100	0.1
MGIT RIF	4ml	83	100	1.0
MGIT EMB	4ml	415	100	5.0
MGIT SM 4.0	2ml	332	100	4.0
MGIT INH 0.4	2ml	33.2	100	0.4
MGIT PZA	2.5ml	8000	100	100

Örnek: Agar proporsiyon testi kayıt formu

Hasta adı soyadı : İnokulasyon tarihi :

Hasta no : Okuma tarihi :

Örnek adı : Test yöntemi :

Plak	Bölme	10^{-2}			10^{-4}			Sonuç
		Koloni sayısı	Kantitasyon	% Direnç	Koloni sayısı	Kantitasyon	% Direnç	
1	kontrol							
	INH 0.2							
	SM 2.0							
	RİF 1.0							
2	Kontrol							
	INH 1.0							
	SM 10.0							
	EMB 5.0							

Örnek: BACTEC radyometrik duyarlılık testi kayıt formu

Hasta adı soyadı : İnokulasyon tarihi :

Hasta no : İnokulum kaynağı :

Örnek adı : İnok. GI değeri :

Test yöntemi :

Rapor tarihi : Okuma programı: (günlük/haftasonu hariç)

	GI															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	ΔGI	Sonuç
Kontrol																--------
Streptomisin 2.0																
İzoniazid 0.1																
Rifampin 2.0																
Ethambutol 2.5																

TÜBERKÜLOZ TANISINDA KLASİK PCR:

"PCR ve RFLP Yöntemleri ile Mycobacterium Türlerinin İdentifikasyonu"

Prof.Dr. Ahmet SANİÇ[1] , Doç. Dr. Ahmet KİZİRGİL[2]
[1]Kafkas Üniversitesi Rektörlüğü, Azerbaycan
[2]Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ.

Mikroskopi ve kültür gibi klasik tanı yöntemleri Mycobacterium'lara bağlı infeksiyonların tanısında önemini eskisi gibi korumakla birlikte daha uzun zaman almakta ve yeni etkenlerin tanımlanmasında yetersiz kalabilmektedir. Moleküler yöntemler oldukça hızlı olmaları ve tanımlama aralıklarının genişliği nedeniyle Mycobacterium infeksiyonlarının tanısında da yaygın kullanım alanı bulmuştur. Mycobacterium infeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin amacı, şu ana başlıklar altında toplanabilir:

- Mycobacterium'ların klinik örneklerde varlığının saptanması,
- Klinik örneklerde bulunan veya kültürde üretilen bakterilerin türlerinin saptanması veya tiplendirilmesi,
- Mycobacterium'ların antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençli olup olmadıklarının araştırılması,
- Moleküler epidemiyolojik araştırmalar ile Mycobacterium infeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkartılması.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

PCR ilk defa Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanmıştır (1). Bu yöntemde çoğaltılması (replikasyon) istenen DNA örneği, replikasyon için gereken maddelerle birlikte bir tüpe konarak, üç değişik ısıda bir döngü (siklus) içerisinde tutulur.

- **Denatürasyon:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda ilk basamak DNA'nın denatürasyonudur. 94-95°C'ye ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır.
- **Bağlanma (annealing):** İkinci basamak bağlanmadır Ortama konmuş ve sadece çoğaltılmak istenen DNA bölgesine özgül iki primer, sıcaklığın (50-70°C'ye) düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA'nın özgül oldukları bölgelerine bağlanırlar.

- **Uzama (ekstansiyon):** Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Ortama konmuş ve optimum sentez sıcaklığı 72-74 °C olan Thermus aquaticus (Taq) polimerazı (ya da ısıya dayanıklı başka polimerazlar) bu ısıda hedef DNA'ya yapışmış primerlerin 3' ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin sentezini yapar.

PCR Uygulamasında Karşılaşılan Sorunlar

- Yalancı pozitif ve negatiflik
- Deneyimli personel ve hassas çalışma gerektirme
- Uzun süre ve iş yoğunluğu
- Özel laboratuar alt yapısı ve ekipman gerektirme
- Sonuçların deneyimli kişiler tarafından yorumlanması
- Standardizasyon gerekliliği
- Maliyet

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

Restriksiyon enzimlerinin (RE)'leri çift zincirli DNA dizisini belli nükleotit dizelerinden (ör. ATGC gibi) tanıyan ve kesen enzimlerdir. Günümüzde yaklaşık 1200 RE tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Sınıflandırmada ilk üç harf enzimin kaynağı olan bakteriyi; romen rakamları da tanımlanma sırasını ifade eder. Örneğin PvuI enzimi Proteus vulgaris'ten elde edilen ilk RE'ni ifade eder. RFLP tüm kromozomal DNA veya PCR sonrası elde edilen DNA'nın RE'leri ile kesilerek DNA parçalarının agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra ethidium bromid ile boyanarak değerlendirilmesi esasına dayanır.

UYGULAMA

PCR ve RFLP YÖNTEMLERİ İLE MYCOBACTERIUM TÜRLERİNİN İDENTİFİKASYONU

Gereken Maddeler

EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit)	Sigma
Trizma Base	Sigma
Borik asit	Sigma

Chelex-100	Sigma
Standard agaroz	Sigma
NuSieve GTG agaroz	FMC BioProduct
Ethidium bromid	Sigma
Taq polimeraz (5 U/µl)	Promega, Roche veya Fermentas
dNTP	Promega, Roche veya Fermentas
Primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'	50 nmol
Primer TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'	50 nmol
Enjeksiyonluk distile su	Eczacıbaşı ilaç

Muhtelif Filtreli pipet uçları: 1-10, 10-100, 50-200 ve 100-1000 µl hacimlerinde
Muhtelif Eppendorf tüpleri: 0.2 ml (ince cidarlı), 0.5 ml, (thermal cycler'da kullanılacaksa ince cidarlı) ve 1.5 ml (yazı yazmak için yan yüzleri pürüzlü) hacimlerinde

Gereken Aletler

Su banyosu veya kuru ısıtıcı blok	Nüve, Clifton veya diğer markalar
Vorteks	Techne veya diğer markalar
Derin dondurucu (-20oC)	Nuarie veya diğer markalar

Buzdolabı 2 adet (temiz ve kirli odada) -20 oC'lik bölmesi olan ve No frost değil

Laminer hava akımlı kabin	CB 1204, dan LAF veya yerli üretim
Mikrosantrifüj	en az 14.000 devir, soğutmalı olabilir
Thermal cycler	Birçok üretici var
Agaroz Jel Elektroforez Sistemi	Birçok üretici var
pH metre	Birçok üretici var
UV transilliminatör	Birçok üretici var
Mikrodalga fırın veya küçük elektrik ısıtıcısı	Birçok üretici var
Mikropipetler (1-10, 10-100, 50-200, 100-1000 l)	Rainin, Biohit, Costar

Çalışmanın Üç Aşaması Bulunmaktadır:

1. Mycobacterium DNA'sının izole edilmesi: DNA izolasyon kiti kullanılacaktır.
2. Mycobacterium DNA'sının çoğaltılması: Spesifik 65 kilo daltonluk ısı şok proteini (hsp65) bölgesinin PCR ile çoğaltılması: Tüberküloz basilleri kompleksi dışındaki mikobakterilerde de bu gen bulunur. Ancak Mikobakteri türleri arasında polimorfizm gösterir.
3. Tüm mycobacterium'lara spesifik 65 kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesilerek mycobacterium türlerinin identifikasyonu.

I. Mycobacterium DNA'sının İzole Edilmesi:

Nükleik asitlerin hücrelerden ayrılarak, fiziksel ve/veya kimyasal işlemlerden geçirilip saflaştırılma işlemi ekstraksiyon olarak tanımlanmaktadır. Bu işlem esnasında nükleik asidlerin parçalanmaya karşı korunması, amplifikasyon inhibitörlerinin ortamdan uzaklaştırılması ve hedef nükleik asidin saflaştırılarak konsantre edilmesi amaçlanmaktadır. Değişik ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir: Fenol-kloroform yöntemi, distile suda kaynatma, deterjanlar + proteinaz K, değişik kimyasalların kullanımı (Chelex-100, Guanidium vb.) ve sonikasyon gibi yöntemler DNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Ayrıca ticari olarak kullanılan DNA/RNA ekstraksiyon kitleri mevcuttur. Mikobakterilerin DNA izolasyonu ekstraksiyon kitleri ile yapılması planlanmıştır.

II. Mycobacteriumlara spesifik hsp65 bölgesinin PCR ile çoğaltılması:

DNA'nın çoğaltılabilmesi için PCR tepkime karışımında gerekli olan elemanlar :

- **DNA Extraktı:** Ekstraksiyonu yapılmış, DNA ekstraksiyon kiti yardımı ile amplifikasyona hazır hale getirilmiş DNA örneğidir.
- **Primer'ler:** Çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan sınırlayan, çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan bir çift sentetik DNA parçalarıdır. Primerler liyofilize halde geldi ise DNAz ve RNAz free distile suda 10 veya 50 pmol/µl olacak şekilde sulandırılır. Daha sonra küçük hacimlere (10-20 örneklik) bölünerek -20oC'de saklanır. Tüm mycobacterium'ların PCR ile saptanması için primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3' ve TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3' kullanılır .

- **dNTP Karışımı:** Amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanmasında kullanılacak olan deoksi nükleotit trifosfatlar (dNTP'ler: eşit oranda dATP, dGTP, dCTP, dTTP)'lardan oluşur. 100 mM konsantrasyonda olan stok dNTP'ler 10 defa DNAz ve RNAz free distile suda sulandırılarak küçük hacimlere (25-50 örneklik) bölünerek -20oC'de saklanır. Sulandırılan bu solüsyondan 50 µl PCR karışımı için 1µl dNTP eklenir.
- **DNA Polimeraz:** PCR çalışmalarının büyük çoğunluğunda Thermus aquaticus (Taq) bakterilerinden elde edilen termostabil Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Taq DNA polimeraz optimal sıcaklıkta (70-80oC) saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyonu ve 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini gerçekleştirme yeteneğine sahiptir (1,16). Taq polimeraz genellikle 5 ünite/µl konsantrasyonda gelir ve -20oC'de saklanır.
- **Tamponlar ve MgCl2:** 10x PCR tamponunda 100 mM Tris ve 500 mM KCl bulunur. Taq DNA polimeraz MgCl2 varlığında etkindir. MgCl2'ün PCR'ın özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum MgCl2 konsantrasyonu olarak 1.5 mM tercih edilir. Düşük Mg+2 iyon konsantrasyonu zayıf ürün oluşumuna, yüksek Mg+2 iyon konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün oluşumuna sebep olmaktadır. 10x PCR bufer ve MgCl2 (25 mM) genellikle Taq enzimi ile birlikte gelir ve aşağıda belirtilen konsantrasyonda kullanılır.

Tablo 1: PCR Karışımının Hazırlanması*:

Distile su	30.75	µl
PCR Bufer (10x konsantrasyonda)	5	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	3	µl
dNTP (10 mM)	1	µl
Primer 1 (TB11, 10 pmol/µl)	2.5	µl
Primer 2 (TB12, 10 pmol/µl)	2.5	µl
Taq polimeraz (5 U/µl)	0.25	µl
Örnek DNA	5	µl
Toplam	50	µl

**Karışım kırık buz üzerindeki 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde hazırlanır.*

Yukarıdaki karışım vortekslenerek karıştırıldıktan sonra santrifüje edilir. Çalışılacak

örnek sayısının çarpımı kadar hazırlanan karışım 45'er µl olarak örnek numaraları yazılmış 0.2 veya 0.5 ml'lik (Thermal cycler'a bağlı olarak) eppendorf tüplerine dağıtılır. Üzerine 5 µl Mycobacterium DNA'sı eklenerek thermal cycler aletine yerleştirilir. Thermal cycler aletinde aşağıdaki siklus programı uygulanır:

Tüm Mycobacterium'lara Spesifik PCR Programı:

94 oC'de	5 dk	1 siklus
94 oC'de	1 dk	35 siklus
55 oC'de	1 dk	
72 oC'de	2 dk	
72 oC'de	8 dk	1 siklus

c) Agaroz Jel Elektroforezi:

Amplifiye edilen PCR ürünleri değişik yöntemlerle belirlenebilir. En yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezidir. PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektrik alanında büyüklüğüne göre ayrılır. Agaroz jelde DNA bantlarının görülebilmesi için PCR ürünlerinin flouresan bir boyayla (ör. Ethidium bromid) muamele edilmesi gerekir. Ethidium bromid'le boyanan DNA bantları ultraviyole (UV) transilliminatör veya epiilliminatör ışığı altında görünür hale gelir. Beklenen PCR ürünlerinin varlığı DNA molekül ağırlık standartları (DNA marker) veya pozitif kontroldeki bant büyüklüğü ile karşılaştırılarak belirlenir. Beklenen PCR ürünü büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonu aşağıdaki tablodan belirlenir.

Tablo 2: Agaroz Konsantrasyonu ile DNA Ayırma Gücü Arasındaki İlişki.

Agaroz Konsantrasyonu (%)	DNA Ayırma Aralığı (*baz çifti*)
0.3	5000 - 60000
0.6	1000 - 20000
0.7	800 - 10000
0.8	500 - 7000
1.2	400 - 6000
1.5	200 - 3000
2.0	100 - 2000

PCR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi:

- İlk olarak PCR ürününü büyüklüğü hesaplanarak kullanılacak jelin agaroz yüzdesine karar verilir (Tablo). 200 ile 3000 baz çifti arasındaki bir ürün için % 1.5'lik agaroz yeterlidir.
- Önce agaroz ve terazinin bulunduğu odaya girilir. Elektroforez tankının büyüklüğüne göre dökülecek jel miktarı belirlenir. Örnek: 40 ml'lik tank için; 0.6 gram agaroz tartılıp 40 ml 0.5X TBE tamponuna ilave edilir.
- Stok 5X TBE bufer (50 gr Tris base, 27.5 gr Boric acid, 20 ml 0.5 M EDTA pH:8.0, 1 litre distile suda eritilir) on defa distile suda sulandırılarak 0.5X TBE bufer kullanma solüsyonu hazırlanır.
- 40 ml 0.5X TBE bufer behere konulur. Üzerine tartılan agaroz eklenerek karıştırılır.
- Mikrodalga fırında 1 dakika 400 Watta tutulur. Mikrodalga yoksa ocak üzerinde arada bir karıştırılarak agaroz eritilebilir.
- Karıştırıldıktan sonra soğuması için beklenirken agaroz jelin dökületeği plate hazırlanır. Örnek sayısına göre 8'li veya 12'li tarak yerleştirilir.
- 50oC civarına kadar soğuyan 40 ml'lik agaroza 4 µl ethidium bromide (5 mg/ml) eklenip karıştırıldıktan sonra jel dökülür.
- Jel donduktan sonra (yaklaşık 30 dakika oda ısısında) plate'nin iki tarafındaki lastikler ve tarak çıkarılır.
- Her örnek için parafilm üzerine 2 µl yükleme solüsyonu (5x Loding bufer: 250 mg Bromophenol blue, 3 ml gliserol, 7 ml distile su) konur. 10'ar µl PCR ürünü 2 µl yükleme solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra sırayla agaroz jele yüklenir.
- 125 voltta 20 dakika veya 90 voltta 60 dakika elektroforez uygulanır.
- Elektroforez durdurulduktan sonra jel UV transilliminatörde incelenir. Beklenen bant görülen örnekler pozitif kabul edilir. Gerekirse poloroid fotoğraf makinası veya jel dökümantasyon sistemi ile jeller fotoğ aflanır.

III. Tüm Mycobacterium'lara Spesifik 65 Kilo Daltonluk Isı Şok Proteini Bölgesine Ait PCR Ürününün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Mycobacterium Türlerinin İdentifikasyonu (10)

Uygun bant görülen (beklenen yerde ve yeterli yoğunlukta) örneklerin 11'er µl'si HaeIII (BsuRI) ve BstEII (Eco91I) enzimleri ile kesilerek Mycobacterium türleri identifiye edilir.

Tablo 3: HaeIII ile PCR ürününün kesilmesi:

Distile su	2.0	µl
Bufer R^+	1.5	µl
*Hae*III (10 U/µl, Fermentas)	0.5	µl
PCR ürünü	11.0	µl
Toplam	15.0	µl

Tablo 4: BstEII ile PCR ürününün kesilmesi:

Distile su	2.0	µl
Bufer O^+	1.5	µl
*Bst*EII (10 U/µl, Fermentas)	0.5	µl
PCR ürünü	11.0	µl
Toplam	15.0	µl

- Enzim ve bufer karışımları örnek sayısınca temiz odada hazırlandıktan sonra 0.2 veya 0.5 ml'lik eppendorf tüplerine 4'er µl olarak bölünür.
- Daha sonra kirli odada üzerlerine 11'er µl PCR ürünü eklenir ve 37oC'de 4 saat su banyosu veya thermal cycler'da tutulur.
- Daha sonra Mycobacterium türlerinin identifikasyonu için restriksiyon enzimleri ile kesilen ve kesilmeyen ürünler birlikte %3'lük NuSieve GTG agaroz (FMC BioProduct)'da yürütülür.
- PCR ürününün kesilmesi ile jel elektroforezde ortaya çıkan bantların bp uzunlukları değerlendirilerek Mycobacterium türleri identifiye edilir (Şekil 1, 2)

KAYNAKLAR

1. Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular Cloning A loboratory Manual. Third edition. CSHL Press, New York, 8.1-8.24.

2. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. American Journal of Respiratory Critical

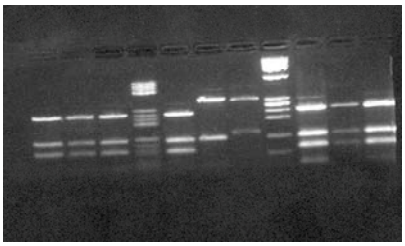
Care Medicine, 161, 1376–1395.
3. Durmaz R. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemlerinde Sorunlar ve Standardizasyon. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Durmaz R (Eds.) 2. Baskı. Kozan Ofset, Ankara, 45-56.
4. Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular Cloning A loboratory Manual. Third edition. CSHL Press, New York, 5.1-5.17.
5. Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach KD. (1996). Specificity of IS6110-based amplification assays for Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol. 34:2843–2846.
6. Gillespie, S. H., & McHugh, T. D. (1997). Monitoring the therapy of pulmonary tuberculosis by nested polymerase chain reaction. Journal of Infection, 35, 324–325.
7. Davies, A. P., Newport, L. E., Billington, O. J., & Gillespie, S. H. (1999). Length of time to laboratory diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection: comparison of in-house methods with reference laboratory results. Journal of Infection, 39, 205–208.
8. Carrino, J. J., & Lee, H. H. (1995). Nucleic acid amplification methods. Journal of Microbiological Methods, 23, 3–20.
9. Wittwer C. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Aplications. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Aplications. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara KI (Eds.) Page:1-8.
10. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. (1997). Routine Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Mycobacteria Growing in Liquid Media. J Clin Microbiol. 35:79-85.
11. Pao CC, Yen B, You JB, et. al. (1990). Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA amplification. Journal Clinical Microbiology, 28: 1877-1880.
12. Almeda J, Garcia A, Gonzales J, et. al. (2000). Clinical evaluation of an ın-hause IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19: 859-867.
13. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. (1991). Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 10: 505-513.
14. Torres M, Criado A, Polomares J, et. al. (2000). Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and ısoniazid resistance-associated

mutations in M. tuberculosis . Journal of Clinical Microbiology, 38(9): 3194-3199.
15. Henegariu O, Heereme NA, Dlougy SR et. al. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol. Bio Techniques, 23: 504-511.
16. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et. al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239:487-491.
17. Pershing DH. (1991). Polymerase chain reaction: trenches to benches. Journal Clinical Microbiology, 29: 1281-1285.

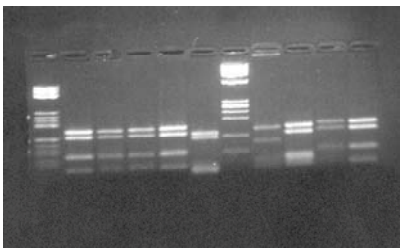
EK:

1. Bazı mycobacterium türlerinin DNA amplifikasyon ürünlerinin BstEII ve HaeIII enzimleri ile kesim sonucu oluşan DNA bant paternleri (Şekil 1)
2. PCR-RFLP ile mikobakterilerin identifikasyon tablosu (Şekil 2)

Şekil 1 : Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün BstEII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri



Şekil 2: Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün HaeIII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri



PCR-RFLP ile MIKOBAKTERILERIN IDENDIFIKASYON TABLOSU*

BstEII	HaeIII	Türlerin Adı
	170-130-0	*M.trivale type 1*
	160-85-55	*M.flavescens type 3*
	145-130-0	*M.lentiflavum type 1*
440	140-100-90	*M.new type 1*
	140-55-50	*M.flavescens type 1*
	130-115-70-55	*M.aurum type 2*
	130-110-0	*M.new*
	130-105-70	*M.szulgai type 1*
325-130	200-60-55	*M.chelonae type 1*
	160-110-0	*M.haemophlium type 1*
	185-140-0	*M.terrae type 1*
	170-140-0	*M.neoaurum type 1*
	145-130-50	*M.simiae type 4*
	140-85-55	*M.chitae type 1*
325-120	140-60-55	*M.nonchromogenicum type 2*
	130-115-60	*M.gordonae type 4*
	130-110-70-55	*M.gordonae type 8*
	130-105-0	*M.genavense type 1*
	130-95-75-60	*M.kansasii type 5*
	200-70-60	*M.abscessus type 1*
	180-135-70-50	*M.thermoresistibile type 1*
	180-130-0	*M.simiae type 1*
	180-100-50	*M.new type 1*
	145-140-100-55	*M.peregrinum type 1*
	145-130-95	*M.scrofulaceum type 1*
	145-130-0	*M.intracellulare type 3*
240-210	145-105-80	*M.marinum type 1*
	145-105-60	*M.new type 1*
	145-70-60-50	*M.abscessus type 1*
	140-120-100-60	*M.pregrinum type 2*
	140-105-80	*M.intracellulare type 2*
	140-80-60-50	*M.phlei type 1*
	130-115-0	*M.gordonae type 5*
	130-105-80	*M.kansasii type 1*
		M.branderi type 1
	130-105-60	*M.avium type 1*
	130-105-0	*M.aium type 2*
	130-80-60	*M.celatum type 1*
240-210	125-110-0	*M.interjectum type 1*
	120-115-110	*M.intracellulare type 4*
	110-105-0	*M.asiaticum type 1*
240-135-80	140-105-70	*M.shimodei type 1*

	160-85-55	*M.species type 1*
	145-140-100-60	*M.peregrinum type 3*
	145-125-60	*M.smegmatis type 1*
	130-105-80	*M.celatum type 2*
240-130-85	130-105-70	*M.gastri type 1*
	130-105-0	*M.kansasii type 2*
	130-100-75	*M.kansasii type 6*
	130-90-70	*M.kansasii type 3*
	130-95	*M.lentiflavum type 4*
	165-115-0	*M.gordonae type 9*
	160-110-60	*M.gordonae type 7*
	145-130-60	*M.intracellulare type 1*
240-120-100	145-130-0	*M.lentiflavum type 3*
	140-105-80	*M.malmoense type 1*
	140-60-0	*M.hibemiae type 1*
	130-110-0	*M.gordonae type 3*
	130-95-60	*M.intracellulare type 4*
	220-110-0	*M.gordonae type 2*
	185-140-50	*M.senegalense type 1*
	160-115-60	*M.gordonae type 1*
	160-105-60	*M.xenopi type 1*
240-120-85	150-130-70	*M.tuberculosis complex*
	150-60-55	*M.nonchromogenicum type 1*
	145-120-55-50	*M.fortuitum type 1*
	140-125-55-50	*M.farcinogenes type1*
	140-95-90	*M.fortuitum type 2*
	130-115-70-50	*M.kansasii type 4*

TÜBERKÜLOZUN MOLEKÜLER TANISINDA TİCARİ SİSTEMLER

"İzotermal Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu Tekniğinin Kullanımı"
Strand Displacement Amplification (SDA)

Doç.Dr.Mustafa ÖZYURT
GATA Mik. ve Klinik Mikrobiyoloji Serv. Haydarpaşa/İstanbul

Tüberküloz (TB), dünyada önemi hergün artmakta olan ve halk sağlığını tehdit edebilen major tehlikelerden biri olup en sık ölüme neden olan infeksiyon hastalıklarından biridir. TB olgularının %95'ten fazlası gelişmekte olan ülkelerde görülmekte olup dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinden fazlası *M.tuberculosis* ile enfektedir. TB hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Bu nedenle ulusal TB kontrol programları çerçevesinde mikobakteriyoloji laboratuvarlarının birincil amacını, insidansı düşürmek için enfeksiyöz akciğer tüberküloz olgularının en kısa sürede tespiti, doğru identifikasyonu ve tedavisinin takibi oluşturur. Bu nedenle klinik mikobakteriyoloji laboratuvarları, tüberkülozun yayılımını önlemede ve kontrol altına alabilmede önemli bir role sahiptir.

Tüberkülozda ilk tanı klinik verilerle yapılmış olsa bile kesin tanı için etken mikroorganizmanın konvansiyonel olarak direkt bakıda tespiti ve laboratuvarda üretilerek tanımlanması esastır. Bu nedenle tanıda "gold standart" kültür ve klinik tanı birlikteliğidir. Laboratuvar tanı için her iki yöntemin de önemli eksiklikleri vardır. Mikroskobik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde 5.000-10.000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir. Kültür ile örnekteki birkaç canlı bakterinin dahi gösterilebilmesi mümkündür ancak mikobakteriler, yavaş üreyen mikroorganizmalar olduklarından bu testlerin tamamlanması için ortalama 2-8 haftaya gereksinim duyulur. Son yıllarda TB ilaçlarına dirençli basillerin izolasyonlarındaki artış ve tanıya yönelik konvansiyonel testlerin pratik olmamaları, uzun zaman gerektirmeleri ve tür düzeyinde tiplendirmede yetersiz kalmaları rutin kullanımda sorunların çözümüne yönelik arayışları yeniden gündeme getirmiştir.

Bu amaçla son 15-20 yıl içinde mikobakterilerin hastalık örneklerinden ve katı-sıvı kültür ortamlarından saptanması, tür düzeyinde tanımlanması ve duyarlılık testleri için, özgüllük ve duyarlılığı yüksek, güvenilir, hızlı sonuç verebilen

ve kolay uygulanabilir yöntemler üzerinde çalışmalar hız kazanmıştır. Bunlardan, Radyometrik (*BACTEC*) ve kromotografik (*HPLC*) sistemler , nukleik aside dayalı moleküler yöntemler, mikobakteriyofajlarla RIF direnç tayini (Faj amplifikasyonu) gibi fenotipik ve genotipik teknikler tanı süresini kısaltmada ve tedaviye yönelik antibiyotik direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasında umut verici yöntemlerdir.

Bu amaçla günümüzde, hasta örneklerinden direkt olarak MTBC varlığını araştırmak amacıyla nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı sistemler ile kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanmasını ve/veya TB ilaçlarına karşı direnç ile ilişkili mutasyonları saptamada, Klasik PCR ve RFLP'nin yanısıra DNA prob hibridizasyonu easlı ürünler, DNA sequence analiz kitleri ve moleküler biyoloji ile bilgisayar teknolojisini birleştiren DNA microarray teknolojisi ürünler tanıya hız kazandırmıştır.

Özellikle Smear pozitif solunum örneklerinde kullanımına FDA tarafından onay verilen nükleik asit amplifikasyon temeline dayanan ticari moleküler sistemlerden (Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD,*Gen-Probe*) ve Cobas AMPLICOR MTB Assay (*Roche Diagnostic System*)) ile FDA onayı olmamakla birlikte diğer kuruluşlardan onay almış ve satışa sunulmuş olan ***BD ProbeTec^{TM}ET*** *Mycobacterium tuberculosis* complex ***DIRECT TB*** *(DTB, BD Biosciences)*' e ait çalışma sonuçları klinik değerlendirmelerde yüksek sensitivite ve spesifite gösterebilmektedir.

CDC (*Center for Disease Control and Prevention*)' nin önerileri doğrultusunda tüberkülozun laboratuvar tanısına yönelik hızlı testler arasında yer alan DNA amplifikasyon teknikleri günümüzde rutin tanıda önemli bir yere sahiptir. Bu tekniklerden biri de Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu "Strand displacement amplification , SDA 'dır.

Bu kursta, SDA teknolojisi prensibi ile çalışan ve 3.jenerasyon bir ticari sistem olan *BD ProbeTec^{TM}ET*'nin doğrudan solunum örneklerinde *Mycobacterium tuberculosis* complex'in saptanması amacı ile üretilmiş Direct TB saptama kitinin *(DTB)* uygulamalı eğitimi verilecek BDProbe Tec ET sistemi ve SDA tekniği tanıtılacaktır.

BDProbe Tec ET sistemi, nükleik asit amplifikasyonu (NAA) esasına dayalı bir yöntem olan SDA prensibi ile çalışan ve floresan enerji transfer saptama teknolojisiyle birleştirilmiş, direkt olarak hastaya ait solunum örneklerinde (balgam, indüklenmiş balgam, BAL ve diğer solunum örnekleri) ve/veya pozitif

kültürlerde *M.tuberculosis* complex'e ait genetik materyali izotermal olarak hedef çoğaltıp saptayabilen, kullanım kolaylığı olan yarı otomatize bir sistemdir.

Hedef DNA, özgül primerler, DNA polimeraz, restriksiyon enzimi ve floresan işaretli saptama probu SDA tekniğinin ana bileşenlerini oluşturur. Bu sistem için primer amplifikasyon hedefi *M.tuberculosis complex*'e özgül bir insersiyon dizisi olan IS*6110*'dur. Söz konusu sistem, örneklerdeki hedef DNA'nın amplifikasyonu ve saptanmasını kapalı bir sistem formatında, SDA için gerekli reaktiflerle kaplanmış koparılabilir stripler halindeki kuyucuklarda gerçekleşirirken aynı zamanda kontaminasyona karşı kısmen güvenli bir ortam sağlar. Sistemde, inhibitör varlığını saptamak amacıyla internal amplifikasyon kontrolü (IAC) kullanılır. Böylece yalancı negatiflikler önlenebilmekte ayrıca kalite kontrol amaçlı pozitif ve negatif kontroller kullanılarak test sonuçlarının güvenilirliği arttırılabilmektedir. Bu testin duyarlılık ve özgüllüğü smear pozitif solunum örneklerinde oldukça iyidir. Testin tedavi görmekte olan hastalarda kullanımı önerilmemekle birlikte tedaviye yeni başlanmış *(1haftadan daha kısa süreli)* hastalarda takip amaçlı kullanılabilmektedir. Hasta örneğinden *M.tuberculosis* complex'in BDProbeTec ET sistemi ile saptanma süresi total olarak yaklaşık 3.5 saat'tir

BD ProbeTec^{TM} ET*Mycobacterium tuberculosis* complex ***DIRECT TB*** *(DTB)*

TESTİN ÇALIŞMA PRENSİBİ

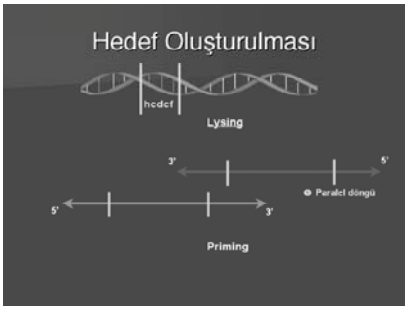
BD ProbeTec^{TM} ET, *Mycobacterium tuberculosis* complex (DTB) Direct Detection Testi, amplifikasyon primerleri ve floresan işaretli dedektör problar kullanılarak şüpheli hastalara ait özellikle NALC-NaOH ile dekontamine edilmiş solunum örneklerinde bulunan *M.tuberculosis* complex'e (M.*tuberculosis, M.bovis, M.bovis* BCG*, M.africanum* ve *M.microti*) ait hedef DNA (IS6110 insersiyon dizisi)'nın aranması ve eş zamanlı amplifikasyonu esasına dayanır.

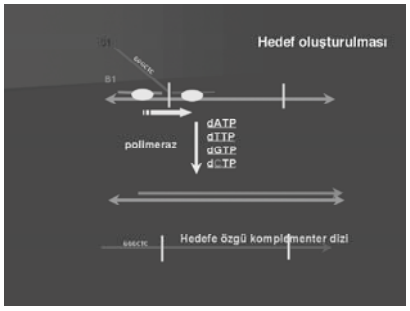
Bu amaçla, kurutulmuş, oda ısısında saklanabilen, SDA için gerekli reaktiflerle kaplı, koparılabilir stripler halindeki disposable priming ve amplifikasyon kuyucukları kullanılır. Test sırasında çalışmaya ayrıca bir reaktif eklemeye gerek duyulmaz. Hazırlanmış hasta örneği, ilk önce içerisinde primerler, floresan işaretli detektör prob ve amplifikasyon için gerekli diğer reaktifleri içeren priming kuyucuklarına inokule edilir. İnkübasyonu takiben kuyucuklardaki reaksiyon karışımı, içerisinde SDA için gerekli bir DNA polimeraz (*Bst* DNA polimeraz) ile

bir restriksiyon enzimi (*Bso*B-I) ve dNTP'ler ile kaplı amplifikasyon kuyucuklarına aktarılır. Amplifikasyon kuyucuklarının üzeri kontaminasyonu önlemek amacıyla kapatılır ve cihaza yerleştirilerek inkübasyona bırakılarak test edilir. Sistemde, reaksiyonlar örnek ve kontroller birarada eş zamanlı olarak gerçekleşir. DNA polimeraz , tek sarmallı zincir üzerinde 5' – 3' yönünde uzamayı başlatır, çoğaltılan çift sarmalı DNA üzerinde 4-8 baz çiftlik spesifik hedef bölge restriksiyon enzimi ile tanınarak kesilir. Kesme işlemi sonrası paralel döngüye gönderilen hedef DNA, ortamda bulunan saç tokası yapısı gösteren floresan işaretli detector problarla hybridize olarak, sistem tarafından Floresan Enerji Transferinin eşzamanlı amplifikasyonu sonucu saptanır.

Bu reaksiyonu detaylı olarak açıklarsak; Öncelikle hasta örneğinde aranılan hedef DNA, ısı veya kimyasallarla denature edilerek heliks yapıdaki iki zincir birbirinden ayrılır ve tek zincirli yapıya dönüştürülür (Şekil 1). DNA zinciri üzerinde yer alan ve sadece aranılan patojene spesifik bir alan, SDA için hedef bölge olarak kullanılır.Yöntemde kullanılan primerler hibrit çifti oluşturmak üzere bu hedefe bağlanan komplementer DNA dizileridir. SDA için diğer bileşenlerden olan DNA polimeraz ortamdaki serbest nükleotidlerin (dNTP) kalıp DNA zincirine bağlanarak zincirin 5' ucundan 3' ucuna doğru uzamasını ve yeni reaksiyonlar için kalıp (templete) DNA oluşumunu katalize eder.

Şekil 1



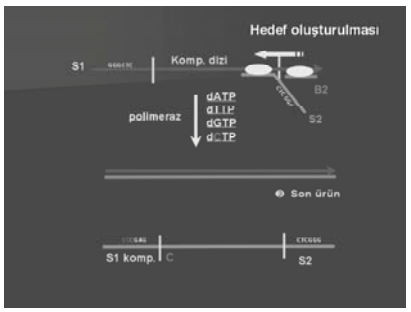


Şekil 2

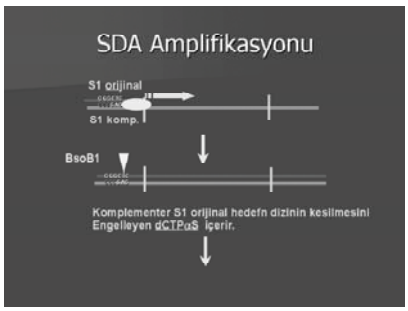
SDA yönteminde izotermal amplifikasyon sırasında 2 "bumper" ve 2 "amplifikasyon" primeri adı verilen iki çift primer kullanılır. Bumper primer amplifikasyon primerinin 5' upstream bölgesinde yer alacak ve amplifikasyon primeri de BsoBI restriksiyon enzimi kesim bölgesi taşıyacak şekilde dizayn edilir. Bu primerler (S1 ve B1) zincire 5' ucundan bağlanır ve termofilik Bst DNA Polimeraz enzimi aktivitesi sonucu yeni DNA zincirleri sentez edilir (Şekil 2). Bu sentez sırasında bumper primerden başlatılan sentez ile ortaya çıkan kalıba komplementer yeni zincir, amplifikasyon primerinden başlayarak kalıp üzerinde 3' yönüne doğru

devam eden sentezle oluşan yeni DNA zincirini kalıptan ayırarak serbestleştirir (displacement). Böylece kalıbın bir zincirinden bumper ve amplifikasyon primerleri ile aynı yönde gerçekleşen DNA sentezi sonucunda kalıba komplementer ve BsoBI kesim bölgesi taşıyan tek iplikli DNA oluşur. S1 ve B1 in her ikiside B1 yönünde uzarken S1 zinciri, orjinal 5'-3' hedefin komplementeri tek zincire dönüşür. SDA yönteminde amplifikasyon, yeni zincirlerin sentezi aşamasında modifiye edilmiş deoksiribonükleotidlerin kullanımı sayesinde gerçekleştirilir. BDProbeTec ET sisteminde bu amaçla thiol grubu ile modifiye dCTP'ler kullanılır. Bunların özelliği sistemde kullanılan restriksiyon enziminin modifiye nükleotidleri taşıyan yeni sentez edilen zincirde kesim yapamamasıdır. S1 zincirindeki sentez sırasında içerisine modifiye dCTP'ler (dCTP(S, deoksisitidin 5'- tiotrifosfat (sitozin) dahil olur. Bu zincir ona bağlanan S2 ve B2 primerlerine komplementer olan sekansları içerir. Bu zincire bağlanan S2 ve B2 primerleri uzayarak S1 ve S2 orjinal primerleri ile sınırlandırılmış bir hedef bölgesi içeren tek zincir oluşturur. Artık S1 komplementeri ve orjinal hedef dCTP(S içerir. Buna S1 primeri bağlanır ve çift sarmallı DNA oluşturmak üzere uzar. Restriksiyon enzimi (BsoB-I, restriction endonuclease) S1orjinal primeri spesifik sekansından keser. Ancak S1 komplementeri dCTP(S içerdiğinden S1 komplementer kopyasını kesemez. Bu kesilmiş kısım polimerazın etkisiyle uzadıkça geride kalan S1 primeri itilmek suretiyle hedef kopya paralel döngüye gönderilir. Bu döngü test süresince süreklilik arzeder ve ortamda milyonlarca kopya oluşur (Şekil 3-6).

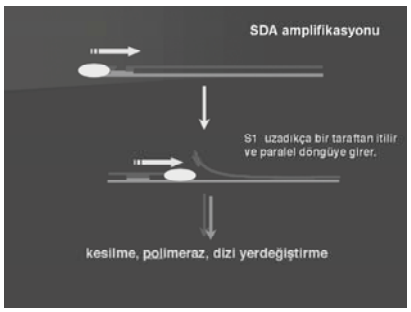
Şekil 3



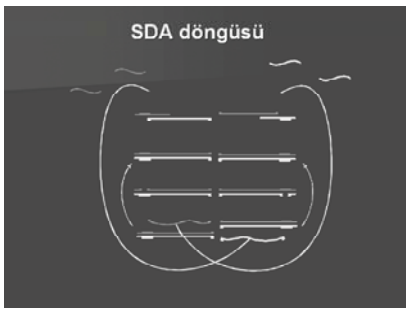
Şekil 4



Şekil 5

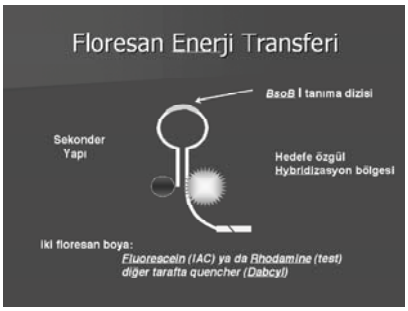


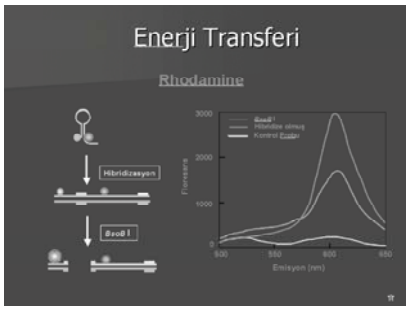
Şekil 6



BDProbeTec ET sisteminde SDA ile ortaya çıkan amplikonların saptanması için Floresan Enerji Transferi prensibine dayanan özel problar kullanılır. Bu probların 3' ucu hedef amplikonlara komplementer bir kısım, kendi içine katlanarak saç tokası (hairpin) oluşturacak komplementer diziler ve bu dizilerin arasında BsoBI restriksiyon enzimi tanıma bölgesi, saç tokası bölgesinin uçlarında ise floresan bir boya (florofor) ve bu boyanın enerjisini emen baskılayıcı molekül (baskılayıcı, quencher) yer alır. Prob saç tokası oluşturduğunda uygun dalga boyunda ışıkla uyarılan floroforun oluşturacağı floresans baskılayıcı tarafından emilir ve saptama sinyali oluşumu engellenir. SDA reaksiyonu gerçekleşip hedef DNA'ların ortaya çıkması ile problar komplementer hedef DNA'lara bağlanır ve DNA polimerazın etkisi ile probun 3' ucundan yeni zincir sentezi meydana gelir. Bu zincire primerlerin bağlanarak yeni bir tur sentez oluşması sonucu komplementer zincirinin sentezi sonucu probun saç tokası yapısı bozulur ve restriksiyon enzimi kesim bölgesi ortaya çıkar. BsoBI restriksiyon enzimi kesimi ile baskılayıcı florofordan uzaklaşır, böylece ortaya çıkan floresans BDProbeTec ET cihazının kameraları ile zamana bağlı olarak saptanır (Şekil 7-8).

Şekil 7



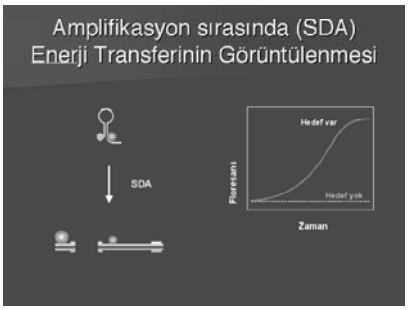


Şekil 8

Oluşan hedef DNA'lar, ortamda bulunan ve "saç tokası" yapısı gösteren floresan işaretli detector problarla eşzamanlı hybridize olur. Bu reaksiyonda her iki floresan molekül birbirlerine yakın iken floreseine gönderilen enerji, floreseinden Rodamini active etmek için transfer edilir. Sonuçta system otomatik olarak pleytteki kuyucuklardan gelen floresan sinyalleri 60 dakikalık test süresince otomatik okuyucuda dakikada bir kez okuyarak RFU (rölatif floresan ünitesi) olarak saptayıp hesaplama yapar (Şekil 8-10). Bu değerlendirme için MOTA (Method other than acceleration) skoru belirlenir. Bu skor, reaksiyon sonrasında oluşan sinyalin değerlendirilmesi ve ölçülmesinde kullanılır. Ortamda aranılan hedefin var olup

olmadığı, hesaplanan MOTA değeri ile hasta örneği veya kontrol için daha önceden belirlenen "cut-off MOTA" değerlerinin karşılaştırılması ile kalitatif olarak saptanır.

Şekil 9



Şekil 10



1. DSA (Dizi yer değiştirme reaksiyonu) tekniği ile çalışır.
2. Amplifikasyon, Izotermal (tek ısıda çoğaltma) olarak gerçekleşir.
3. Amplifikasyon ve floresan saptama eş zamanlı olarak 1 saatte gerçekleşir
4. SDA için gerekli bütün primer, prob, enzim gibi reaktifler koparılabilir striplere ait kuyucuklara kaplıdır,
5. Test sırasında ayrıca reaktif eklemeye gerek yoktur. Kitler 96 kuyucukludur.
6. Amplifikasyon aşamasında kuyucukların üzeri bir bant ile kapatılarak kontaminasyon engellenir
7. Tek odada çalışma kolaylığı sağlar
8. Güvenilirdir, internal amplifikasyon kontrolü (IAC) kitin içinde mevcuttur
9. Kitler oda ısısında saklanabilir
10. Yarı otomatize bir system olup cihaz bakımı ve test prosedürü kolaydır
11. Kinetik okuma ile sonuçların yorumu kolaydır.

12. DTB kit prosedürü, balgam bronco alveolar lavaj, broşiyal ve trakeal aspirate gibi solunum örnekleri için test edilmiştir. Diğer numuneler için performansı değerlendirilmemişitir.

13. DTB testi *M.tuberculosis* complex'i diğer *M. tuberculosis, M.bovis, M.bovis BCG, M.africanum, ve M.micoti*'den ayıramaz.

14. M. tuberculosis complex probe sekansı , IS*6110 M. tuberculosis, M.bovis, M.bovis BCG, M.africanum, ve M.micoti* için spesifiktir.

15. Testin optimal performansı için uygun numune alımı ve transportu gerekmektedir.

16. DTB Testi M.tuberculosis complex varyantlarını IS6110 insersiyon sekans eksikliği olduğundan saptamaz.

17. DTB testi kalitatif sonuçlar verir. MOTA değerleri ile pozitif numunedeki hücre sayısı arasında korelasyon yoktur.

DİKKAT EDİLMESİ GEREKLİ HUSUSLAR

1. Test performansı , solunum örnekleri dışındaki diğer numunelerden (Kan, BOS, gaita, ve idrar için) *M. tuberculosis complex*'ın saptanmasına yönelik değerlendirme yapılmamıştır.

2. Priming kuyucuklarında insan Plasental DNA'sı kullanıldığından reaktifler infeksiyöz olarak değerlendirilmelidir.

3. Isı inaktivasyonu işlemine kadar numune işlemleri Class II Biyolojik Emniyet Kabininde yürütülmeli, bu peryoda kadar olan santrifüj işlemleri aresol koruyuculu rotor kullanılarak yapılmalıdır. Aerosol koruyuculu rotor güvenlik kabininde açılmalıdır.Standart rotor ısı ile inaktivasyon işleminden sonra kullanılmalıdır.

4. Örnekler CDC önerileri dikkate alınarak NALC-NaOH metodu ile dekontamine edilmeli veya alternative olarak aynı içerikli hazır dekontaminasyon kitleri (Ör: BBL Mycopreb kiti) kullanılmalıdır.

5. Örnekler hemen çalışılmayacaksa NACL/NaOH sedimentleri 2-8 C'ta 5 güne kadar bekletilebilir. 5 günden daha uzun sure çalışılmayacaksa 3 ay'a kadar -20 C veya daha soğukta dondurularak bekletilebilir. Dondurulmuş örnekler, çalışmadan once oda ısısına getirilerek çözülmelidir.

6. Tüm numuneler, MOTT yönünden de araştırılmalı ve Antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması amacıyla kültürleri yapılmalıdır.

7. Numunelerde HIV veya Hepatit B gibi patojenik infeksiyonlar mevcut olabileceğiden numuneler enfeksiyöz olarak kabul edilerek gerekli laboratuvar prosedürleri , uluslarası öneriler takip edilmelidir.

8. DTB Wash Buffer 1 ve DTB Nötralizasyon Buffer 3 dimetilsulfoksid içerir. Dimetil sulfoksid solunduğunda veya cilt ile temasta yüksek toksiktir. Göze sıçraması halinde bol su ile yıkama yapılmalıdır. Kontamine kıyafetleri hemen

üzerinizden çıkartın ve cildinizi su ve sabunla yıkayın.

9. DTB Wash Buffer1 ve DTB Lysis Buffer yüksek alkalidir. Cilt ,göz ve mukoz membran ile kontak edilemesinden sakınılmalı. Kontak edilmesi durumunda derhal bol su ile yıkama yapılmalıdır . Yıkama yapılmadığı durumlarda yanıklar oluşabilir.

10. Pipet uçlarını, numune tüplerini, Priming kapaklarını atarken uygun laboratuvar prosedürlerini uygulayın.

11. Özel santrifüjleme önerileri uygulanmalıdır, uygunsuz santrifüjleme yalancı negatifliğe sebep olabilir.

12. DTB testi antibiyotik tedavisi için kültür yönteminin yerini tutamaz.

13. Pirimer ve Amplifikasyon Mikrokuyucuk poşetleri kullanımdan sonra dikkatlice yapıştırılmalıdır. İçerisinde nem tutucu varlığından emin olunmalıdır

14. Amplifikasyon kuyucukları BD ProbeTec ET cihazına yerleştirilmeden önce özel yapıştırıcılı kapağı ile muhakkak kapatılmalıdır. Yapıştımak cihazı, çalışma alanını kontaminasyondan korur. Yapıştırıcıyı hiç bir zaman mikrokuyucuklardan ayırmayın.

15. Test plağında 48 mikrokuyucuk (numune ve kontrol dahil) olması durumunda tam plağı kapatan yapıştırıcılı kapak kullanılmalıdır.

16. Çalışma alanının kontaminasyondan korunması için tek kulanımlık yapışkanlı torbaları kullanın. Amplifikasyon kuyucuklarını atarken bu yapışkanlı plastik torbaları kullanın.

17. Eldivenlerin değiştirilmesi kross kontaminasyonun engellenmesi için önemlidir.

18. Her çalışma öncesi ve sonrası ile kontaminasyon durumlarında alanının, cihazın, işlenmiş numunelerin %1'lik sodium hipklorit ile temizledikten sonra deiyonize su ile durulanır ve kuruması için beklenir.

19. Sonik banyonun ısısını ölçmek için civalı termometre yerine dijital termometre kullanımı tercih edilmelidir. Bu cihazla birlikte sağlanmaktadır.

KİT İLE BİRLİKTE VERİLEN MALZEMELER

1. DTB Priming Microwells, 3X32
2. 4 Oligonucleotid ≥7.6 pmol; human DNA ≥6 mg; dNTP ≥37.6 nmol; Detector

probes ≥30 pmol; Synthetic oligonucleotides ≥10,500 copies.
3. DTB Amplification Microwells, 3x32
4. Restriction enzyme ≥25.5 units; DNA Polymerase ≥8 units; dNTPs ≥10 nmol.
5. Priming kuyucukları için Plastik kapak; Amplification kuyucuklarını kapatarak kontaminasyonu önlemek için yapışkanlı kart (Sealer 1/2), Disposal kilitli poşetler (8'li) .
6. DTB Wash Buffer 1 – (225 mL) Üre, CAPS Buffer, dimethyl sulfoxide, glycerol ve sodium hydroxide içeren solusyon
7. DTB Lysis Buffer 2 – (50 mL) potassium hydroxide solusyonu
8. DTB Neutralization Buffer 3 – (150 mL) bicine, potassium hydroxide, dimethyl sulfoxide, glycerol and koruyucu olarak 0.03%Proclin™ içeren solusyon
9. DTB Pozitif kontrol ve DTB Negatif kontrol

KİTLE BİRLİKTE VERİLMEYEN , ÇALIŞMA İÇİN GEREKLİ MALZEMELER

- Class II Biyoemniyet kabini
- Mikrosantrifüj , 12,200 X *g* rotor kapasiteli aerosol kapaklı
- Vorteks mixer,
- Disposable eldivenler,
- Falkon tüpleri (5 ml'lik)
- Dijital termometre
- Mikropipetler (20-100 µL , 200-1000 µL hacimli)
- Filtreli pipet uçları (10 µL, 100 µL, 500 µL, 600 µL and 1 mL hacimli)
- % 1'lik sodium hypochlorite
- Tezgah üstü tıbbi atık kutusu

FİRMA TARAFINDAN TEMİN EDİLEN CİHAZ VE MALZEMELER

- Ana cihaz **(BDProbeTec** ET Instrument) ve metal plak,
- Isıtıcı (**BDProbeTec** ET Priming ve Warming Heater),
- Fırın (**BDProbeTec** ET Oven) ,
- Sonikatör (**BDProbeTec** ET Sonic Bath ve sonic bath insert),
- **BDProbeTec** ET Pipettor ve Güç kaynağı
- Örnek tüp rakı, Pipetleme rakı, 2 mL'lik örnekleme santrifüj tüpleri burgulu kapaklı, 2 mL'lik burgulu tüp kapakları

HASTA ÖRNEKLERİNİN DEKONTAMİNASYONU VE SAKLANMASI

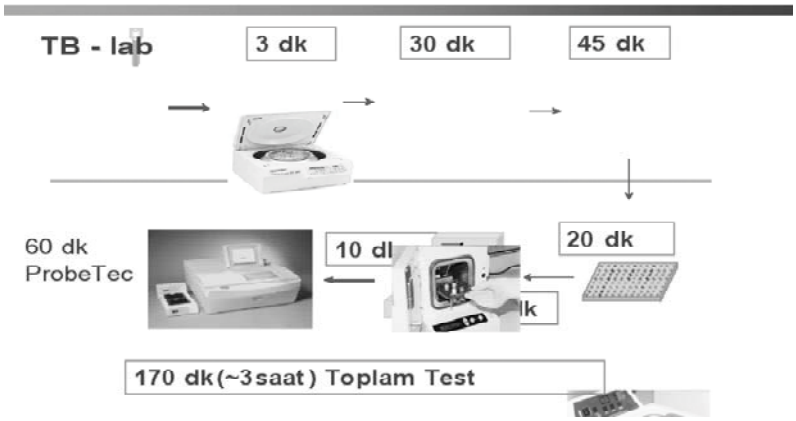
Tüm solunum örneklerine CDC'nin önerileri doğrultusunda NALC-NaOH metodu ile veya bu içerikte hazır kitlerle dekontaminasyon işlemi uygulanır.

Örnekler hemen çalışılmayacaksa;

1. NALC-NaOH sedimenti 5 güne kadar 2-8C 'de bekletilir.
2. Daha uzun süre çalışılmayacaksa 3 aya kadar -20 C veya daha soğukta dondurularak bekletilebilir.

Dondurulmuş örnekler çalışılmadan önce oda ısısında çözülmelidir.

BD ProbeTEC ET *M. tuberculosis* Complex **DIREKT TB CALISMA PROSEDÜRÜ**



Şekil 11 test işlemi akış şeması

I-ÖRNEK HAZIRLAMA PROSEDÜRÜ (Şekil11-12)

A. ÖRNEK HAZIRLAMA (BİYOEMNİYET KABİNİ DIŞI İŞLEMLER**)**

a) Tüm buffer'lar oda ısısında tutulmalı ve kullanım öncesi iyice karıştırılmalıdır. Stok buffer solusyonlarından örnekler aşağıdaki gibi hazırlanır;

- **DTB Wash Buffer-1**: Her NALC-NaOH sedimenti için kaba 1 ml aktarılır. Ayrıca pipetleme hatası göz önüne alınarak 1-2 ml ekstra ilave edilir.
- **DTB Lysis Buffer-2**: Her NALC-NaOH sediment ve kontroller için kaba 0.1 ml aktarılır. Ayrıca pipetleme hatası göz önüne alınarak 0.5-1 ml ekstra ilave edilir.

o **DTB Nötralizasyon Buffer-3**: Her NALC-NaOH sediment ve kontroller için kaba 0.6 ml aktarılır. Ayrıca pipetleme hatası göz önüne alınarak 0.5-1.0 ml ekstra ilave edilir.

b) Daha sonra artan bufferlar stok solusyonların içerisine konmaz atılır .

c) Çalışılacak her hastaya ait NALC-NaOH sediment için 2 ml'lik örnek tüpleri hazırlanır ve üzerleri örnek numarası ile etiketlenir.

d) Tüplerin kapakları açılarak her tüpe 1ml DTB Wash Buffer-1eklenir ve tüplerin kapağı kapatılır.

e) Hasta örneklerine ait **DTB Wash Buffer-1** ilave edilmiş tüpler biyoemniyet kabinine (BSC) bırakılır.

B. İŞLENMİŞ HASTA NUMUNELERİNDEN YAPILAN İŞLEMLER (BİYOEMNİYET KABİN İÇİ İŞLEMLER**)**

Kontamine örnekleri dökmek için kabin içinde infekte sıvı atık kabı bulundurulur.

a) Falkon tüplerindeki NALC-NaOH sedimentleri 5 sn vortexlenir

b) Filtreli pipet ucu kullanarak sedimentlerden 500 µL alınıp içerisinde **1 ml DTB Wash Buffer-1** içeren tüpe eklenerek tüpün kapağı kapatılır.

c) Buraya kadarki işlemler her hasta numunesi için uygulanır.

d) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR

e) Her tüp 5sn. Vortexlenir

f) Tüpleri aerosol koruyuculu rotora yerleştirilip rotor kapağı iyice kapatılarak mikrosantrifujede 12,200 X g 'de 3 dk. çevrilir . Uygun şekilde santrifüj edilmemesi yanlış negatifliğe sebep olabilir.

g) Santrifüj sonrası süpernatan kabin içerisinde sıvı atık kabına dökülür.

h) Tüpler, kapakları kapatılarak numune rakına yerleştirilir.

i) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR

C. ÖRNEKLERE ISI UYGULAMA

a) Tüplerin kapaklarının sıkıca kapalı olduğu kontrol edilir.

b) Numune rakındaki numuneler fırına yerleştirilir, kapağı kapatılır

c) RUN #01 seçilir ve OK'e basılır

d) Uygulamayı başlatmak için "Start" tuşuna basılır, 30 dk. süreyle ısı uygulaması gerçekleştirilir.

e) Isıtma başladıktan sonra aşağıdaki basamaklar takip edilir

- Sonikatör hazırlanır (Sonikatör musluk suyu ile su seviyesi dikkate alınarak doldurulur, içerisine banyo rakı yerleştirilir, Isıtıcı 65°C'ye ayarlanır ve ısıtma işlemi başlatılır. Cihaz kapağı kapalı halde iken 60 dk Degas işlemi yapılır.)
- Santrifüje standart motoru yerleştirilir

f) 15 dk'lık ısıtmadan sonra, ısının ≥ 95°C'e ulaşıp ulaşmadığını kontrol et.g) Fırındaki ısıtma bittiğinde sesli kapıyı açarak numune rakını çkartılır.

Not: *Numune tüplerindeki muhtemel mikobakterilerin artık öldüğü varsayılır. Bu aşamadan sonraki işlemlere kabin dışında devam edilebilir. Ancak numunelere yinede bioyolojik tehlikeli madde olarak muamele edilmelidir*.

D. ÖRNEK DNA' NIN AÇIĞA ÇIKARILMASI (Lysis)

a) Isıtma işlemi tamamlanan numune tüpler mikrosantrifüje konur.

b) Santrifijün kapağı kapatılır ve kısa süreli (10 sn.) çevrilir.

c) Santrifüj sonrası tüplerdeki yoğunluk kontrol edilir ve gerekirse işlem tekrarlanır.

d) Tüpler numune rakına yerleştirilir.

e) Filtreli pipet ucu ile her bir tüpe **100 µL DTB Lysis Buffer 2** eklenir.

f) Her bir numune için ayrı bir pipet ucu kullanılmalıdır.

g) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR.

h) Tüm tüpler 5 sn. vortexlenir ve tüpler numune rakına iyice yerleştirilir. Bununla maksimum düzeyde ultrasonik enerjiye maruziyet sağlanır.

i) Ultrasonik banyoda su seviyesi ve ısının 65 (+/- 5)°C olup olmadığı dijital termometre ile kontrol edilir.

j) Tüpler numune rakından Sonik Banyo Rakına yerleştirilir ve kapağı kapatılır .

k) 45 dk. Süreyle sonikasyon gerçekleştirilir.

l) Sonikasyon sonunda numune rakı kurutma amacıyla havlu kağıt üstüne konur.

E. NÖTRALİZASYON

a) Sonike edilmiş numune tüpleri standart rotor yerleştirilmiş mikrosantrifüje konur.

b) Santrifijün kapağını kapatılır ve kısa süreli (10 sn.) çevrilir.

c) Santrifüj sonrası yoğunluk kontrol edilir gerekirse santrifüj işlemi tekrarlanır.

d) Tüpler temiz pipetleme rakına yerleştirilir.

e) Filtreli pipet ucu ile her bir tüpe **600 µL DTB Nötralizasyon Buffer 3** eklenir.

f) Her bir numune için ayrı bir pipet ucu kullanılmalıdır.

g) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR

h) Her tüp 5 sn. Vortexlenir

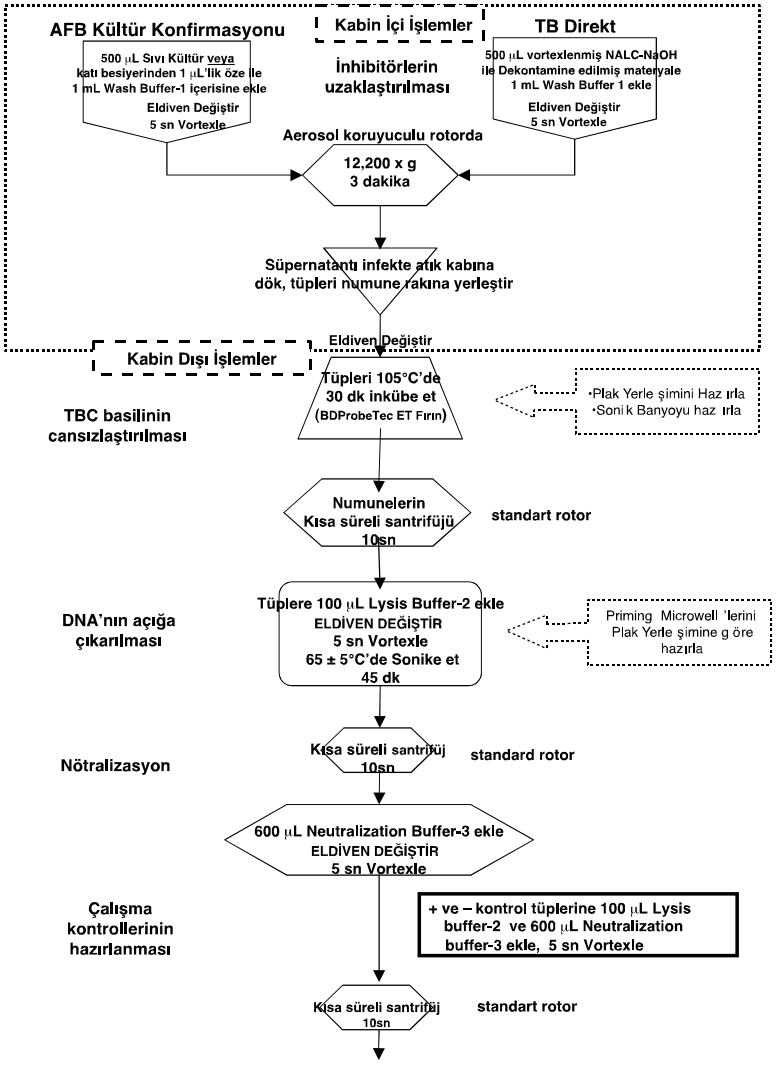
i) Tüpler, tekrar temiz pipetleme rakına yerleştirilir.

Numuneler artık BDProbeTec ET Sisteminde amplifikasyon için hazırdır. Ancak bu aşamada numuneler opsiyonel olarak bekletilebilir. Bu amaçla;

- 18-33°C'de 12 saate kadar.
- 2 – 8°C'de 4 güne kadar saklanabilir. Çalışmadan önce numuneler için ısıtma aşaması tekrarlanmalıdır.
- –20°C veya daha düşük ısılarda 3 aya kadar dondurulmuş olarak saklanabilir.

Bu numunelere çalışma öncesi oda ısısında çözdürülerek ve ısıtma aşaması tekrarlanmalı ve 10 sn kadar santrifüj edilerek yoğunluğu kontrol edilmelidir.

Şekil 12 : BDProbeTec^{TM} ET Direkt TB Örnek Hazırlama Prosedürü



II. AMPLİFİKASYON HAZIRLIK VE TEST İŞLEMLERİ

A. TEST CİHAZLARINI HAZIRLAMA

Test işlemi öncesi sistemle ilgili tüm cihazların çalışma ısısıları ayarlanarak durumları stabil hale getirilir.

- Priming heater 72.5°C ve Warming Heater 54°C olmalı
- BDProbeTec ET cihazı ekranında ısı 47.5-55.0 °C okunmalıdır

B. BDProbeTec ET Pipettor PROGRAMLAMA

- **Program 1** Çalışma örneklerinden 200 µL ul çekilir –Priming kuyucuklarına 150 µL ul dağıtılır.
- **Program 5** Priming kuyucuklarından 100 µL çekilir – Amplifikasyon kuyucuklarına 100 µL dağıtılır, 50µL ile 3 kez karıştırılır

C. BDProbeTec ET CİHAZINA ÖRNEK YÜKLEME DÜZENİNİ PLANLAMA

Hasta örneklerine ait bilgi girişi, kit ve kontrol lot numaraları sisteme girilir. Priming ve Amplifikasyon kuyucuklarının ayırımı ve örnekleme için koparılabilir striplerin yerleşimi ayrı ayrı düzenlenir.

D. ÇALIŞMA KONTROLLERİNİN HAZIRLANMASI

- DTB Lysis Buffer 2 ve DTB Nötralization Buffer 3 kullanım öncesi oda ısısında bekletilir ve iyice karıştırılır.
- Her çalışmaya bir **DTB Negatif** ve bir **DTB Pozitif Kontrol** tüpü ilave edilir. Bu tüplerin her birine yeni bir pipet ucu ile **100 µL DTB Lysis Buffer 2** ve **600 µL DTB Nötralizasyon Buffer 3** eklenir.
- Tüpler 5sn vortexlenir .
- Vortekslemeyi takiben mikrosantrifüjde 10 sn santrifüj edilir ve tüpler temiz pipetleme rakına yerleştirilir.

E. TEST PROSEDÜRÜ (Şekil : 13-19)

a) Kontrol ve numune tüp kapakları açılır.
b) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR
c) Plate yerleşim planına göre Priming kuyucukları hazırlanır,
d) Pipet programı seçilir (DTB Pipet Prog 1), pipetörün uç aralıkları ayarlanır
e) Numune ve kontrol tüplerinden 200 µl çekilir.

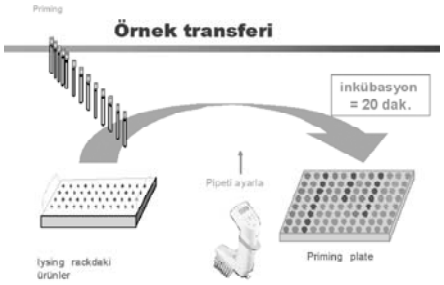
f) Pipet aralığı kapatılır ve Priming kuyucuklarına 150 µL numune aktarılır (Aktarma yapılırken kuyucukların duvarına doğru bırakmak kross kontaminasyonun önlenmesi için önemlidir).

g) Pipet uçları atılır ve numune tüpleri yeni kapaklarla kapatılarak kaldırılır.

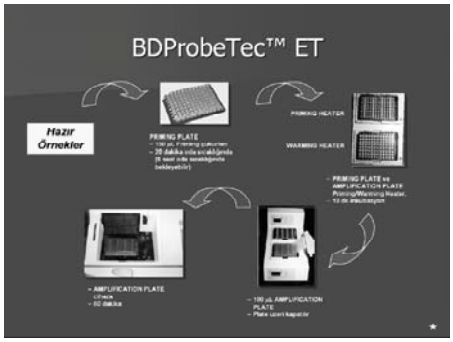
h) Priming kuyucuklarının üzeri plastik kapağı ile kapatılarak 20 dk oda ısısında inkübasyona bırakılır (Bu süre 6 saate kadar uzatılabilir)

i) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR

Şekil 13



Şekil 14



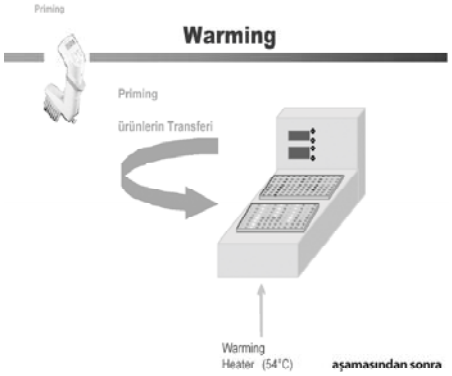
j) İnkübasyon süresinin sonuna doğru Priming kuyucuklarının hazırlanışına benzer şekilde Amplifikasyon kuyucukları hazırlanır

k) Süre sonunda Priming kuyucukları üzerindeki plastik kapak çıkartılır ve Priming Isıtıcısına (72(C) konulur. Buna paralel olarak aynı zaman dilimi içerisinde hazırlanan Amplification kuyucuklarıda Amplifikasyon ısıtıcısına yerleştirilir (54 (C). 10 dk. (+ / - 1 dk.) beklenir. Bu aşamada süre oldukça kritiktir.

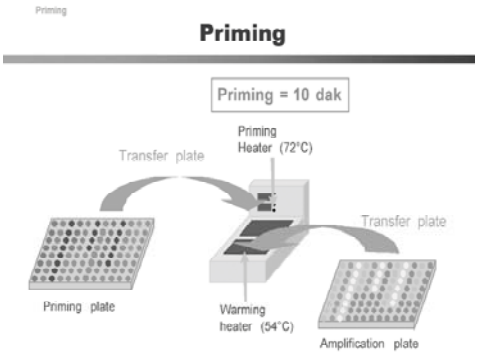
l) İnkübasyon sırasında Pipetörde "DTB Pipet Prog 5" seçilir. Süre bitiminde Priming kuyucuklarından 100 µL alınıp Amplifikasyon kuyucuklarına aktarılır ve hava kabarcığı oluşturmadan pipet programının 50 µL 'lik hacmi ile üç kez karıştırılır.

m) İşlem tamamlandığında Amplifikasyon kuyucuklarınının üzeri yapışkan bir kart ile tüm test kuyucukları tamamen kapatılır. Yapışkanlı kapak plağın dışına çıkmamalıdır (aksi takdirde cihazdaki okumalarda hata çıkabilir.)

Şekil 15



Şekil 16



n) Amplifikasyon kuyucuklarını taşıyan plak 30 sn içinde BDProbeTec ET cihazına yerleştirilir ve cihaz çalıştırılır. (Şekil 17)

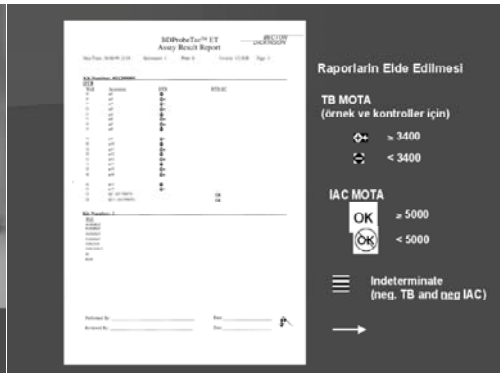
o) Çalışma tamamlandığında rapor otomatik olarak cihazın yazıcısından alınır (Şekil 18)

p) Cihazdan işlemi tamamlanmış plak dışarı çıkartılır. Kuyucukların yapıştırıcısı açılmadan metal plaktan çıkartılarak atık poşetine konur. Poşetin ağzı kapatılarak atık kabına bırakılır.

q) Metal Plak %1 sodyum hipoklorit ile temizlenir distille veya deiyonize su ile silinir ve temiz bir kağıt havlu ile kurutulur.

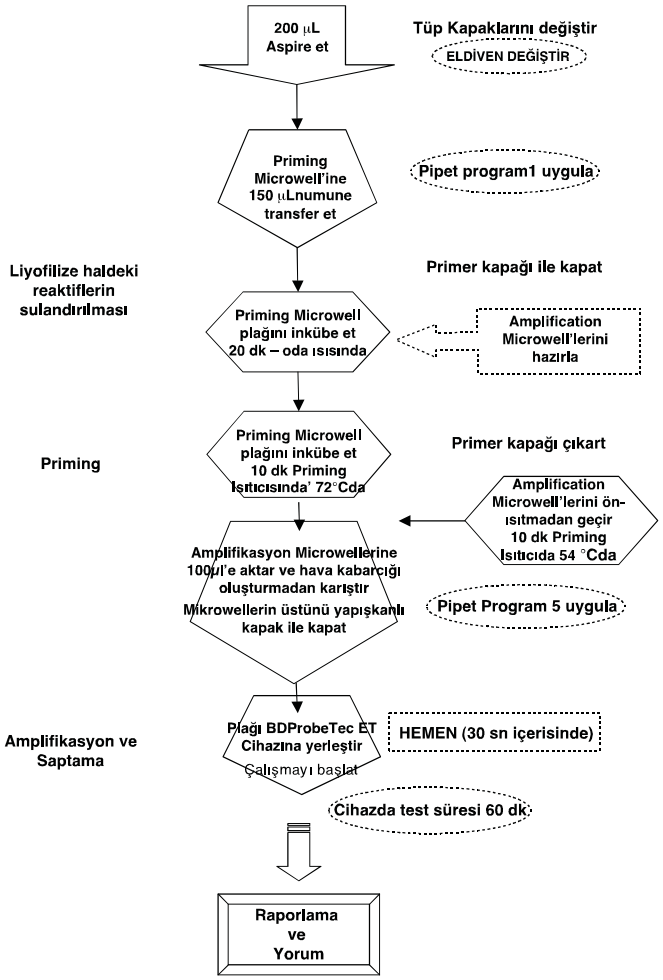


Şekil :17
BDProbeTec ET amplifikasyon ve detection cihazı



Şekil 18:
Çalışma Raporu ve Yorumu

Şekil 19: BDProbeTec^{TM} ET Direkt TB Test Prosedürü



F. DEĞERLENDİRME

Cihazın verdiği MOTA (Method Other Than Acceleration) skoru; Reaksiyon sonunda oluşan sinyalin değerlendirilmesinde ve ölçülmesinde kullanılır

(Tablo 1). Bu değerler;

• İlk dakikadaki background okumasından çıkartılarak elde edilir.

• Bu değer eğimin altında kalan alanı tanımlar

• Test tamamen kalitatifdir; amplifikasyon numuneden numuneye değişiklik göstersede, MOTA değeri ile numundeki hedef miktarı arasında bir bağlantı yoktur.

Tablo : 1 Beklenen Cut-off MOTA değerleri

Örneğin MOTA Değeri	IAC MOTA Değeri	Açıklama
> 3.400	Bakılmaksızın	Pozitif
<3.400	>5.000	Negatif
<3.400	<5.000	Testin tekrar edilmesi gerekli

G. KALİTE KONTROL

Her çalışma için ve farklı kit lot numarası için 1 Poizitif ve 1 Negatif Kontrol birlikte çalışılmalıdır. DTB Pozitif kontrolü reaktif hatalarını, pipetleme ve inkübasyon gibi çalışma prosedür hatalarını denetler. DTB Negatif kontrolü ise reaktif ve dış çevre kontaminasyonlarını denetler. Numunelerin raporlanması için Negatif kontrol negatif, Pozitif kontrol pozitif olarak sonuçlanmalıdır. Kontroller beklendiği gibi sonuçlanmaz ise sonuçlar değerlendirilemez ve rapor edilemez. Bu durumda tüm çalışma yeni kontroller, kuyucuklar ve işlenmiş numuneler ile tekrar edilmelidir.

Internal Amplifikasyon Kontrolü (IAC) Priming kuyucuklarının içinde bulunmaktadır. IAC, Amplifikasyonu, reaksiyonu ve örnekteki potansiyel inhibisyonun varlığını denetler.

Çalışmada örnek hazırlamadaki etkinliği test etmek amacıyla her laboratuvar kural olarak *M.tuberculosis* H37Ra ATCC kontrol suşuna ait 1 Mc Farland yoğunluktaki bir süspansiyonu prosedür kontrolü olarak rutin çalışmalara dahil etmelidir.

KAYNAKLAR

1. Alp A.: Mikobakterilerin tanı ve identifikasyonunda moleküler yöntemler. 3.Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, Ankara, Sayfa: 95-99, 2004

2. Barret A, Magee J.G , Freeman R .: An evalution of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens.

J Clin Microbiol (2002) Oct; 51(10):895-98
3. Bemer MP, Germaud P, Drugeon HB. : Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by a commercial polymerase chain reaction kit. Pathol Biol (Paris) 1998 Oct ; 46 (8):597-603
4. Bergmann J.S, Keating W.E, Woods G.L.: Clinical evaluation of the BD ProbeTec ET system for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol (2000) Feb; 38(2):863-65
5. Bogard M, Vincelete J, Antinozzi R, et all. : Multicenter study of Commercial, Automated Polymerase Chain Reaction System for the Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Specimens in Routine Clinical Practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2001) 20 : 724-731
6. Gerdes R.: Evaluation of BD Probe Tec ET System for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis from Clinical respiratory specimens using Strand Displacement Amplification technology. Abstr.U-68 , ESM 2000
7. Johansen I.S, Thomsen V, Johansen A, Andersen P, Lundgren B.: Evaluation of a New Commercial Assay for Diagnosis of Pulmonary and Nonpulmonary Tuberculosis . *Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2002) 21 : 455-460*
8. Kocagöz T.: Tübeküloz tanısında yenilikler. H.Eraksoy, O.Ş.Yenen (Edt.),İnfeksiyon hastalıkları ve Klinik mikrobiyoloji 2000, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Yayınları. No.19 , sayfa :25-33, 2000
9. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Rugiero G, Nista D, Bornigia S.: Performans assesment of two commercial amplification assays for Direct Detection for *Mycobacterium tuberculosis* Complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol (2002) Nov; 40(11):4138-42*
10. Scarparo C, Picolli P,Rigon A, Ruggiero G, Nista D, Piersimoni C.: Direct identification of mycobacteria from MB/BacTalert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. *J Clin Microbiol (2001) Sep; 39(9):3222-27*
11. Schmidt E., Feldman K.: Clinical evaluation of BD Probe Tec ET System for direct detection of Mycobacterium tuberculosis from Clinical respiratory specimens.Abstr.M004, ESM 2000
12. Wang S.X, Sng LH., Tay L.: Preliminary study on rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by the BD Probe Tec ET system. Journal of Medical Microbiology, 2004, 53; 57-59
13. Woods GL.The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. Infect Dis Clin North Am. 2002 Mar;16(1):127-44
Woods GL.: Molecular Techniques in Mycobacterial Detection. Arch Pathol Lab Med.2001; 125: 122-126

NOTLAR

NOTLAR

NOTLAR

NOTLAR

NOTLAR