

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Mycobacterium tuberculosis* BESİYERLERİNİN MODİFİKASYON  
ÇALIŞMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Şefika İPEK ÇELİK**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Ufuk ABBASOĞLU

ANKARA  
Haziran 2008



## İÇİNDEKİLER

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| Kabul ve Onay                                             | I         |
| İçindekiler                                               | II        |
| Şekiller                                                  | IV        |
| Tablolar                                                  | V         |
| Kısaltmalar                                               | VI        |
| <br>                                                      |           |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                           | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                  | <b>2</b>  |
| 2.1 Tarihçe                                               | 2         |
| 2.2 Tüberkülozun Epidemiyolojisi                          | 4         |
| 2.3 Bulaşma                                               | 5         |
| 2.4 Güvenlik Önlemleri                                    | 6         |
| 2.5 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in Mikrobiyolojisi | 6         |
| 2.5.1 Taksonomi                                           | 6         |
| 2.5.2 <i>Mycobacterium</i> ' ların Antijenik yapısı       | 9         |
| 2.5.3 <i>Mycobacterium</i> ' un morfolojisi               | 11        |
| 2.6 Klinik Bulgular                                       | 14        |
| 2.7 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' in Tanısı         | 15        |
| 2.7.1 Geleneksel İndirekt Tanı Yöntemleri                 | 16        |
| 2.7.2 Geleneksel Direkt Tanı Yöntemleri                   | 17        |
| 2.7.2.1 Kültürlerin Değerlendirilmesi                     | 21        |
| 2.7.3 Yeni İndirekt Tanı Yöntemleri                       | 23        |
| 2.7.4 Yeni Direkt Tanı Yöntemleri                         | 24        |
| <b>3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR</b>                             | <b>27</b> |
| 3.1 Mikrobiyolojik Çalışmalar                             | 27        |
| 3.1.1 Gereç ve Yöntemler                                  | 27        |
| 3.1.1.1 Mikroorganizmalar                                 | 27        |
| 3.1.1.2 Besiyerleri                                       | 27        |
| 3.1.1.3 Cam Malzemeler                                    | 28        |
| 3.1.1.4 Cihazlar                                          | 28        |
| 3.1.2 Yöntem                                              | 29        |
| 3.1.2.1 Malaşit Yeşili Solüsyonunun Hazırlanması          | 29        |
| 3.1.2.2 Yumurtaların Hazırlanması                         | 29        |
| 3.1.2.3 Löwenstein- Jensen Besiyerinin Hazırlanması       | 29        |
| 3.1.2.4 Modifiye-A Besiyerinin Hazırlanması               | 30        |
| 3.1.2.5 Modifiye-B Besiyerinin Hazırlanması               | 30        |
| 3.1.2.6 Modifiye-C Besiyerinin Hazırlanması               | 31        |
| 3.1.2.7 Modifiye-D Besiyerinin Hazırlanması               | 31        |
| 3.1.3 İnokulum Hazırlanması                               | 32        |
| 3.1.4 Besiyerlerine İnokulasyon                           | 32        |
| 3.2 İstatistiksel Analiz                                  | 33        |
| 3.3 Besiyerlerinin Maliyeti                               | 33        |
| 3.3.1 Löwenstein- Jensen Besiyerinin Maliyet Hesabı       | 33        |

|                                             |           |
|---------------------------------------------|-----------|
| 3.3.2 Modifiye-A Besiyerinin Maliyet Hesabı | 33        |
| 3.3.3 Modifiye-B Besiyerinin Maliyet Hesabı | 34        |
| 3.3.4 Modifiye-C Besiyerinin Maliyet Hesabı | 34        |
| 3.3.5 Modifiye-D Besiyerinin Maliyet Hesabı | 34        |
| <b>4. BULGULAR</b>                          | <b>35</b> |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                          | <b>40</b> |
| <b>6. SONUÇ</b>                             | <b>44</b> |
| <b>7. ÖZET</b>                              | <b>45</b> |
| <b>8. SUMMARY</b>                           | <b>46</b> |
| <b>9. KAYNAKLAR</b>                         | <b>47</b> |
| <b>10. EKLER</b>                            | <b>52</b> |
| <b>11. ÖZGEÇMİŞ</b>                         | <b>53</b> |

| <b>Şekiller</b>                                                                  | <b>Sayfa</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Şekil 1:</b> Tüberkülozun bulaşması, enfeksiyon gelişimi ve hastalık gelişimi | 4            |
| Şekil 2: <i>Mycobacterium</i> ’ lar ve ilişkili türler için taksonomik ağaç      | 7            |
| Şekil 3: <i>M.tuberculosis</i> ’in hücre duvar yapısı                            | 12           |
| Şekil 4: <i>M.tuberculosis</i> ’in mikroskopik görüntüsü                         | 19           |
| Şekil 5: <i>M.tuberculosis</i> ’in katı kültürde koloni morfolojisi              | 20           |
| Şekil 6: Havuçlu ve elmalı Modifiye besiyerlerinde koloni morfolojisi            | 38           |
| Şekil 7: Patatesli Modifiye-A Besiyeri ve Havuçlu Modifiye-B’nin görünüşleri     | 38           |

| <b>Tablolar</b>                                                                             | <b>Sayfa</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Tablo 1: Ernest Runyon'a göre Mycobacterium türlerinin sınıflandırması                      | 9            |
| Tablo 2: Tüberküloz tanısında mikroskopi materyalleri                                       | 15           |
| Tablo 3: Mikroskopik değerlendirmenin önemi                                                 | 18           |
| Tablo 4: <i>M.tuberculosis</i> 'in üremesi için kullanılan besiyerlerinin sınıflandırılması | 22           |
| Tablo 5: Kültür sonuçlarının DSÖ kriterlerine göre değerlendirilmesi                        | 23           |
| Tablo 6: Besiyerlerinin toplam maliyeti                                                     | 34           |
| Tablo 7: Besiyerlerinde kullanılan maddeleın ekonomik değeri                                | 35           |
| Tablo 8: Besiyerleri içerisinde günlere göre suşlar arasında üreme skorları dağılımı        | 39           |
| Tablo 9: Zamana bağılı olarak besiyerleri arasında üreme skorları skorlarının dağılımı      | 39           |
| Tablo 10: Besiyerleri ve suşlar arasında üreme skorları grafiğı                             | 40           |

## KISALTMALAR:

**ARB** : Aside Rezistan Basil  
**SPSS** (Statistical Package for Social Science)  
**BCG** : Basil Calmette-Guerin (Verem Aşısı)  
**BAL**: Bronko alveoler lavaj  
**YER** : Yıllık Enfeksiyon Riski  
**PPD (Tuberculin)**: Purified Protein Derivative  
**TDM** : Tüberküloz dışı mikobakteri  
**G**: Guanin  
**C**: Sitozin  
**DNA** : Deoksiribonükleik asit  
**RNA** : Ribonükleik asit  
**NTM**: Tüberküloz dışı mikobakteriler; Non tuberculosis Mycobacteria=  
**MOTT**: Tüberküloz basili dışındaki mikobakteriler=Mycobacteria Other Than tuberculosis bacilli  
**HBV**: Hepatit B Virusu  
**HIV**: Human Immunodeficiency Virus (Bağışıklık Sisteminin Çökmesine Neden Olan Virus)  
**CNM** : Corynebacterium. Nocardia, Mycobacterium  
**hsp**: Isı şok proteinleri  
**LAM**: Lipoarabinomannan  
**LM**: Lipomannan  
**OT**: Old Tuberculin  
**BACTEC** : Radyometrik kültür yöntemleri  
**MGIT** : Mahatma Gandhi Institute of Technology (Kültür Sistemi)  
**ADA**: Adenozin Deaminaz  
**PCR**: Polimeraz zincir reaksiyonu  
**PANTA** : kontaminant bakterilerin üremesini engelleyen antibiyotik sıvısı  
**DSÖ**: Dünya Sağlık Örgütü  
**HPLC**: High-Performance Liquid Chromatography  
**YTL**: Yeni Türk Lirası  
**g**: Gram  
**ml**: Mililitre  
**CDC**: Centers Disease Control  
**°C**: Santigrad derece  
**>**: daha büyük  
**<**: daha küçük  
**pH**: hidrojen iyon konsantrasyonu  
**<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>** : işaretli karbon içeren karbondioksit

**µm** : Mikrometre  
**kDa**: Kilodalton  
**PIM** : Protein Interaction Maps  
**SL**: Sulfatidler  
**mAGP**: ,mikolil-arabinogalaktan-peptidoglikan kompleksi  
**GAD**: gecikmiş tip aşırı duyarlılık  
**Pq**: Potasyum Silicat  
**ATP**: Adenozin trifosfat, canlıların kullandığı enerji.  
**NaOH**: Sodyum Hidroksit  
**HCl**: Hidroklorik asit

## 1. GİRİŞ

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis*’ın neden olduğu, en çok morbidite ve mortaliteye yol açan bir hastalıktır. Dünyada yaklaşık iki milyar kişi enfektedir. Yılda yaklaşık dokuz milyon kişinin hastalığa yakalandığı ve iki milyon kişinin öldüğü bilinmektedir<sup>1</sup>.

Tüberküloz ilaçlarının keşfedildiği 1945 sonrasında uygulanan programlar ve ilaç tedavisi olanaklarına rağmen hastalıkta artma izlenmektedir. O dönemlerde daha etkili bir mücadele yapılmaması durumunda her yıl ortaya çıkan yeni hasta sayısının on milyon, ölümlerin ise dört milyona ulaşacağı tahmin edilmiştir<sup>2</sup>.

*M. tuberculosis* yavaş üreyen bir bakteri olduğundan, tanıda kullanılan klasik kültür yöntemlerine dayanan izolasyon çalışmaları 1–2 ay sürebilmektedir. Hızlı kültür sistemlerinin geliştirilmesiyle bu süre ancak yarıya indirilmiştir<sup>3,4</sup>. Etken, birkaç gün içinde moleküler tekniklerle belirlenebilmektedir. Ancak, bu yöntemler, uygulamadaki zorlukları nedeniyle, yaygın kullanıma girememiştir<sup>5</sup>.

Bu çalışmada; besiyerlerinin formülasyonu araştırmalarında temin edilebilen maddeler ve düşük maliyet ön plana alınarak besiyeri modifikasyonları denenmiştir. Çalışma klasik kültür yönteminde yaygın olarak kullanılan Löwenstein-Jensen ve dört farklı modifiye besiyeri, *M. tuberculosis*’ın çabuk ve yoğun üreyebilmesine dayanarak, erken tanı koyabilmek ve en ekonomik olanı saptamak amacıyla yapılmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Tarihçe

*M. tuberculosis*’ın neden olduğu hastalığı tanımlamak için kullanılan “tüberküloz” kelimesi Yunanca ekli bir latince sözcüktür ve ilk kez 19.yüzyıl.’da Laennec ve Bayle tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Kelimenin köken aldığı “tuber” kelimesi “tumesco” fiilinden gelmektedir ve Latince de dejeneratif şişliklerin bütün türleri veya kemik-beden yüzeyindeki yuvarlak şekilli çıkıntılar anlamındadır<sup>6</sup>. Hastalık tüberküloz olarak isimlendirilmeden önce farklı kültürlerce şu şekilde adlandırılmıştır; Arapça da “Dikk” (erime hastalığı, ince ağrı) ve “Sill” (erime, verem, soyulmuş, incelmış) kelimeleri kullanılmaktadır. Sill (Silliürrie) kelimesinden türetilerek, kınından sıyrılmış kılıca “Seyf-i meslul” ve buradan yola çıkarak da tüberküloz olanlara “meslul” denilmiştir. Bu dönemde İranlılar da Araplar gibi “meslul” veya “Girihdar”, Türkler ise “verem” ve “müteverim”i kullanmışlardır. Bu kelimelerin tamamında ortak olarak bulunan anlamların “erime, zayıf düşme, tükenme” olduğu görülmektedir<sup>7</sup>.

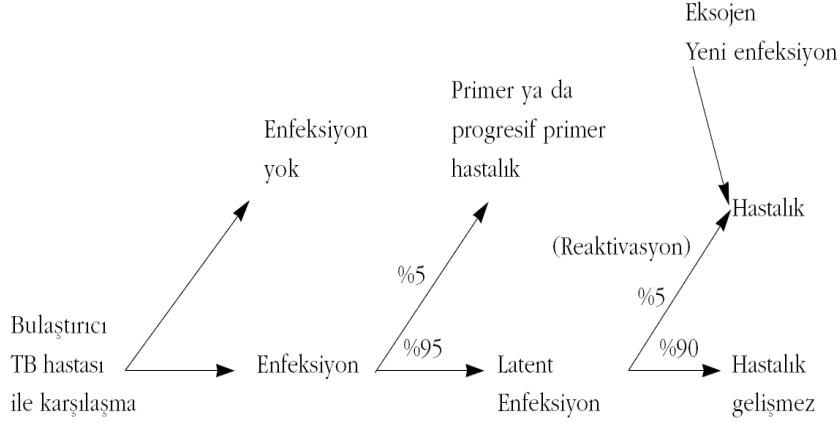
Tüberküloz edebiyat çevreleri tarafından da romantik bir hastalık olarak tanımlanmıştır ve bir ölçüde romantizm akımının doğuşuna kaynaklık etmiştir. Dönem sanatçıları tüberküloz hakkında duygusal algılamaları, onun insan toplumu üzerinde hâkimiyetini, yıkıcılığını ve yeni anlamını göstermektedir. Tüberkülozdan ölüm, vücudun maddi kabalığını eriten, kişiliğine tinsellik katan, bilinci genişleten bir süreç olarak algılanmıştır. Böylece hastalıkla neredeyse manevi bir yüceliğe ulaşıldığını söyleyenler olmuştur<sup>8</sup>.

Tüberküloz, insanlık tarihi boyunca toplumların gündeminde kalmış araştırmacıların ilgi odağı olmuş başlıca sağlık problemlerinden biridir. Denizli’de travertenler içinde bulunan ilk insan fosil kafatasında yaklaşık 500 bin yıl öncesinde kemikte tüberkülozun yaptığı lezyonlar saptanmıştır<sup>9</sup>. Bazı neolitik ve erken dönem mısır buluntularında, insan iskeletlerinde ve duvar resimlerindeki insan figürlerinde spinal pott hastalığının yol açtığı deformiteleri andıran değişikliklerin saptanması, tüberkülozun ilk çağlardan beri var olduğunun önemli göstergesidir<sup>6</sup>. İnsanların yerleşik yaşam düzenine geçmediği dönemlerde olasılıkla sporadik olgular şeklinde görülen tüberküloz, nüfusun artması ve toplumsal birimlerin oluşmasıyla, yavaş bir hızda da olsa, yayılmaya başlamıştır. Mcgrath, bir toplumda tüberkülozun endemik olabilmesi için, konak patojen ilişkisinin 180–440 bireylik bir sosyal ortamda sabit olarak devam etmesinin gerektiğini ileri sürmüştür. Tüberküloz, endüstri devrimine kadar, sporadik görülen önemsiz bir hastalık olarak sürmüştür. 16. yy sonlarında ve 17. yy’da İngiltere’de büyük bir patlama yapmıştır o dönemdeki ölümlerin dörtte birinden sorumlu tutulmuştur<sup>10</sup>. Yüksek mortalitesi nedeniyle “The

captain of all these men of death” (ölümün tüm adamlarının kaptanı), “The great white plaque” (büyük beyaz veba), yakalanan insanlarda ağır derecede zayıflık hali meydana getirmesi nedeniyle “consumption” (yiyip bitirme, eriyip tükenme) ve “ince hastalık” gibi deyimlerle anılmıştır<sup>6</sup>. 18. yy’da Avrupa’nın diğer kısımlarında da pandemik yayılmalar gerçekleşmiştir. Bu dönem dünyada tüberkülozdan ölümlerin en yüksek düzeyde yaşandığı bir dönemdir. 19. yy’ın ortalarından itibaren Osmanlı İmparatorluğunu ciddi anlamda etkilemeye başlayan tüberküloz salgını birçok padişahın da ölümüne neden olacak yaygınlığa ulaşmıştır<sup>11</sup>.

Tüberküloz hastalığı genel tıp tarihinde; Hipokrat’dan önceki, milattan önceki dönem; hastalığın kliniğinin tanımlanmasından başlayarak Rönesans etkisiyle gerçekleşen anatomo-klinik çalışmalara kadar olan dönem; hastalığa ilişkin anatomi ve patoloji çalışmalarının yapıldığı dönem ve mikrobiyoloji devriminden günümüze kadar geçen süreç olmak üzere dört dönemde ele alınmıştır<sup>12</sup>.

Tüberküloz tarihinin en önemli dönüm noktası, 24 Mart 1882 tarihidir. Berlin Fizyoloji Derneği’nin o gün yapılan toplantısında Robert Koch, tüberküloza neden olan basili bulunduğunu açıklamıştır ve *M. tuberculosis* olarak adlandırmıştır. Röntgen ışınlarının keşfedilmesi ve bunun akciğere uyarlanması tüberküloz hastalığının tanısında çok önemli olmuştur. Bunu 1921’de, tüberküloz aşısı olan BCG’nin Fransız araştırmacılar Calmette ve Guérin tarafından bulunması, 1944’de Waksman tarafından da ilk tüberküloz ilacı olan streptomisin’in bulunması izler<sup>11</sup>.



**Şekil 1: Tüberkülozun bulaşması, enfeksiyon gelişimi ve hastalık gelişimi<sup>13</sup>**

## 2.2. Tüberküloz Epidemiyolojisi

Bir toplumdaki tüberküloz sorunlarının boyutlarını kavramak, zaman içindeki seyrini izlemek ve alınan kontrol önlemlerinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla, değişik epidemiyolojik ölçütler kullanılmaktadır.

1- Tüberküloz enfeksiyon prevalansı: Belirli bir toplumda, çalışmanın yapıldığı anda, infekte bulunan kişilerin oranıdır. Genellikle belirli bir yaş grubunda BCG ile aşılanmamış kişiler arasında tüberkülin cilt testi (TCT) pozitif olanların yüzde olarak oranı şeklinde ifade edilir.

2- Tüberküloz enfeksiyon riski: Belirli bir toplumda, tüberküloz basili ile infekte olmamış kişilerin (BCG'siz ve TCT negatif), bir yıl içinde infekte olma olasılığı olarak tanımlanır ve genellikle yıllık enfeksiyon riski (YİR) olarak adlandırılır.

3- Tüberkülozda mortalite hızı: Belirli bir toplumda, bir yıl içerisinde, 100.000 nüfusta tüberkülozdan ölenlerin sayısını gösterir.

4- Tüberküloz prevalansı: Belirli bir toplumda, araştırmanın yapıldığı anda 100.000 nüfusta bulunan tüberkülozlu hasta sayısını (eski ve yeni) gösterir.

5- Tüberküloz insidansı: Belirli bir toplumda, bir yıl içerisinde, 100.000 nüfusta saptanan yeni tüberkülozlu hastaların sayısını gösterir.

Günümüzde bir toplumdaki tüberkülozun durumu ve seyrini değerlendirmede en güvenilir epidemiyolojik ölçütler, direkt mikroskopik incelemede basil pozitif bulunan hastaların insidansı ile yıllık enfeksiyon riski ve enfeksiyon riskindeki yıllık değişim hızıdır. Yayma pozitif hasta insidansı, vaka bulma çalışmalarının ve bakteriyolojik incelemelerinin kalitesinden doğrudan etkilenmektedir. Yıllık enfeksiyon riski ucuz, basit, kolayca tekrarlanabilen ve kayıt-ihbar sistemine dayanmayan bir epidemiyolojik ölçüt olduğundan günümüzde oldukça yararlı bir gösterge olarak değerlendirilmektedir. Fakat YİR ölçümü için BCG uygulanmayan bir toplum kesimi olması gereklidir. Bu nedenle ülkemizde uygulanamamaktadır. Eğer bir toplumda YİR'in azalma oranı her yıl %5'den daha azsa, uygulanan kontrol programı yetersiz demektir. Çünkü toplumun sosyo-ekonomik gelişmesine bağlı olarak YİR'de her yıl %5 oranında bir doğal azalma zaten beklenmektedir. YİR'de her yıl %10'dan fazla azalma gerçekleşiyorsa, o toplumda uygulanan kontrol programı yeterli olarak değerlendirilebilir<sup>14</sup>.

### 2.3 Bulaşma

*M. tuberculosis* enfeksiyonlarının hemen hepsi, basil taşıyan bulaştırıcı damlacıkların inhalasyonu ile oluşur. *M. tuberculosis* ile infekte olan için "nefes almak" yeterli bir risk faktörüdür<sup>15</sup>. Havada belirli konsantrasyonda bulunan mikobakterilerin hava yoluyla insana bulaşıp enfeksiyon yapması uzun süre tartışılan bir konu olmuştur. Çeşitli araştırmacıların bulaştırıcı partiküllerin konuşma, öksürme, aksırma, şarkı söyleme gibi eylemlerle dışarı atıldıklarını ortaya koymaları, bu konudaki tartışmaları sonlandırmıştır. Öksürme ve beş dakika süreyle konuşma sırasında çapı 100 µm'den küçük, ortalama 10 µm olan üç bin kadar bulaştırıcı damlacığın, aksırmasıyla ise bir milyondan fazla sayıda damlacığın ortama yayıldığı ileri sürülmüştür. 10 µm çapındaki bir partikülün 3–10 basil taşıyabildiği bildirilmiştir. Partikülde yaşam döngüleri, kendi su buharı basıncı atmosfer basıncı ile eşitlenene kadar sürer. Mikobakterileri taşıyan toz partikülleri de hava akımı ile geçici olarak havalandıklarından enfeksiyon kaynağı olabilirler. İn hale edilen basillerin yalnızca %6'sı alveollere ulaşır. Büyük çaptaki partiküllerin çoğu zemine iner, diğerleri de üst solunum yollarının mukozasında tutunur ve silyer aktivite ile ya da öksürükle dışarı atılır. Bulaşta başlıca değişken, basil sayısı ve konsantrasyonudur. Solid veya nodüler lezyonlarda  $10^2$ – $10^4$  basil, kaviteli lezyonlarda  $10^7$ – $10^8$  basil olduğu ileri sürülmüştür. Bunun yanı sıra, basil ile karşılaşma süresi ve çevreye yayılan partiküllerin aerodinamiği de etkenin bulaşmasında önemli parametrelerdir ve canlı tek basilin inhalasyonunun bile enfeksiyona yol açabileceği ileri sürülmektedir<sup>15</sup>.

Hava yolu dışındaki bulaşma biçimleri *M. tuberculosis* için seyrekler. *Mycobacterium bovis* enfeksiyonları, infekte inek sütünün içilmesiyle oluşabilir. Ancak süt ve süt ürünlerinin pastörize edilerek kullanılmasının yaygınlaşması ve infekte hayvanların itlafı sonucunda bu bulaş biçimi de giderek azalmıştır<sup>16</sup>.

#### 2.4. Güvenlik Önlemleri<sup>17</sup>

Klinik örnekler *M. tuberculosis*, HBV, HIV gibi bulaştırıcı ajanlar içerebilir. Potansiyel patojenleri taşıyan hasta materyalleri ve kültürlerle çalışırken her zaman, uygun biyo-güvenlik kabini içinde çalışmayı ve eldiven, önlük, maske gibi kişisel koruyucu gereçler kullanmayı içeren önlemler alınmalıdır. Potansiyel patojenin biyolojik atıklarının atılması için ve laboratuvar kazaları durumunda yerel kurallar uygulanmalıdır.

- Derideki kesiklerin, sıyrıkların ve diğer lezyonların iyi bir şekilde korunduğundan emin olunmalı, mukoz membrana sıçramaya karşı ve temas için önlemler alınmalıdır.
- Çalışma alanında yiyecek, içecek, kozmetik ürün saklanmamalı ve tüketilmemelidir. Sigara içilmemelidir.
- Materyaller ağızla pipetlenmemelidir.
- Tek kullanımlık eldiven kullanılmalı ve çalışma sonrası eller su ve sabunla yıkanmalıdır. Şayet ellere ya da çalışma alanlarına kontamine materyal bulaşmış ise mutlaka dezenfektanlarla gerekli temizlikler yapılmalıdır.
- Örneklerle yapılan tüm çalışmalarda aerosol oluşturacak davranışlardan mümkün olduğu kadar kaçınılmalıdır. Balgam kaplarını açarken, balgam örneğini kaptan alırken ve yayma yaparken dikkatli olunmalı, biyo-güvenlik kurallarına uyulmalıdır.
- Laboratuvar çalışma alanında daima temiz ve düzenli tutulmalı, kontamine materyaller en kısa sürede atılmalıdır.

#### 2.5 *Mycobacterium tuberculosis*'in Mikrobiyolojisi

##### 2.5.1 Taksonomi

Mycobacteriaceae, Actinomycetales'lerin birinci ailesidir. *M. tuberculosis*, *Mycobacterium* cinsinin bir türüdür<sup>15</sup>. Mikolik asit üretme ve benzer Guanin + Cytosin (G+C) oranına sahip olma gibi ortak özellikleri nedeniyle *Corynebacterium*, *Nocardia* ve

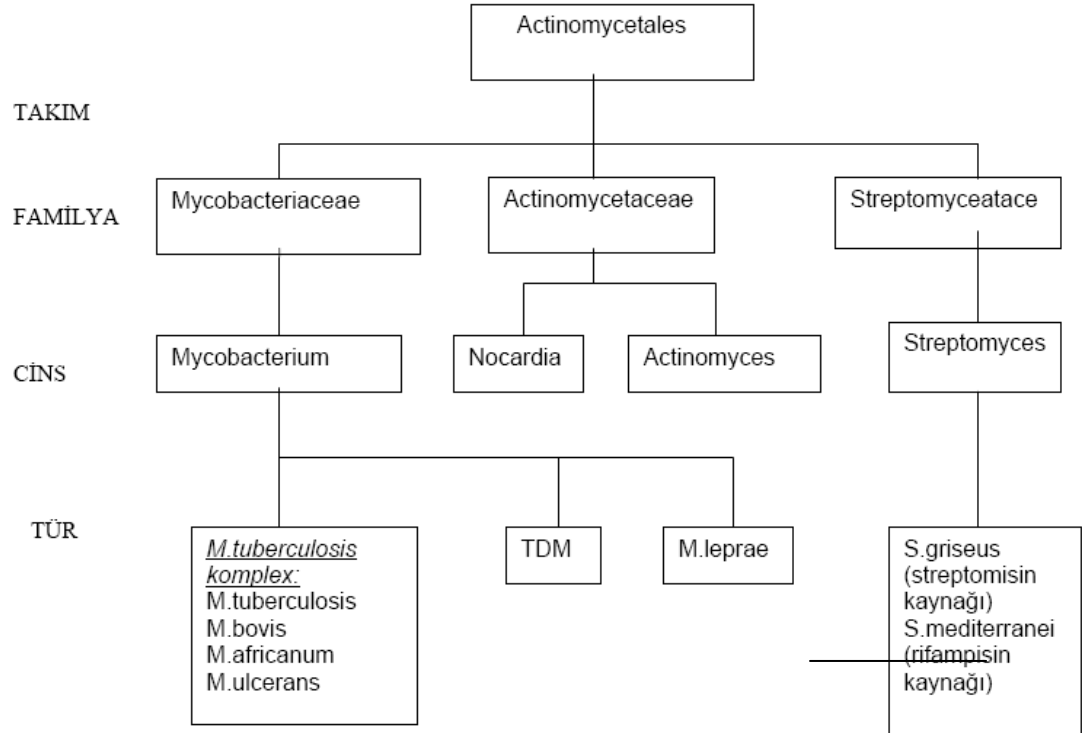
Mycobacteriumlar CNM grubu olarak anılsalar da; mikobakteriler, Bergey'in sınıflandırmasına göre ayrı bir bölüm içinde yer almıştır<sup>18</sup>. Sadece Mycobacterium'lar tam olarak aside dirençli boyanma özelliği gösterirken, diğer cinslerde farkı derecelerde kısmi aside dirençlilik söz konusudur<sup>19</sup>. Mycobacterium'ların tür özellikleri, DNA/DNA homolojileri ve sayısal taksonomiye göre değerlendirildiğinde, *M. tuberculosis* ve buna yakınlık gösteren *M. bovis*, *M. africanum*, *M. ulcerans* ve *M. microti* birlikte "*Mycobacterium tuberculosis* kompleksini oluştururlar. Şekil 2'de şematize edilmiştir. Genel bir tanım içinde insanda enfeksiyon yapan tüberküloz basilleri denildiğinde, *M. tuberculosis* kompleksini oluşturan basillerden *M. microti* dışındakiler anlaşılmaktadır<sup>20</sup>.

Mycobacterium diğer bakterilerle kıyaslandığında, mutasyon hızları yaklaşık 10 kat daha yüksektir. Bu nedenle ilaç uygulandıktan sonra diğer bakterilere oranla 10 kat daha fazla dirençli mutant mikroorganizma canlı kalır. Organizmaları yok etmek için tedavi sırasında kombine ilaç kullanılması en doğru davranıştır<sup>21,20</sup>.

*M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. africanum* benzer klinik özellikler gösterir ve bu üç türün homolog oldukları, ribotipleme ile doğrulanmıştır. Bu nedenle aynı türler olarak değil, *M. tuberculosis*'in varyantları olarak düşünüldüklerinden; tüberküloz terimi ile *M. tuberculosis* eş anlamda kullanılmaktadır<sup>22,23</sup>.

Türlerin ayrımı için üreme sıcaklıkları, pigmentasyon özellikleri, kimyasal maddelere direnç durumu, değişik biyokimyasal aktiviteleri, mikolik asit, mikolik asit pirolizis esterleri, spesifik DNA problemleri ile hibridizasyon çalışmalarına gerek vardır<sup>23</sup>. Bununla birlikte 1959'da ki Ernest Runyon'un ortaya attığı ve Tablo 1. de görüldüğü gibi; üreme hızı, katı besiyerinde oluşturdukları koloni morfolojisi ve pigmentasyonlarına göre belirlenen dört ana grup günümüzde de kullanılmaktadır<sup>22,24</sup>.

"*M. tuberculosis* kompleksi" ve *M. leprae* dışındaki mikobakteriler, önceleri "sınıflandırılmamış", "atipik", "anonim" gibi isimlerle anıldıktan sonra, 1990'da Amerikan Toraks Derneği tarafından tüberküloz basili dışındaki mikobakteriler; "*Mycobacteria Other Than tuberculosis bacilli* (MOTT)" veya "*Non tuberculosis Mycobacteria* (NTM), Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM)" olarak adlandırılmıştır<sup>25</sup>.



Şekil 2: *Mycobacterium*'lar ve ilişkili türler için taksonomik ağaç<sup>26</sup>.

Tablo1. Ernest Runyon'a göre Mikobakteri türlerinin sınıflandırılması<sup>4</sup>

| TÜR                                                   | PATOJENİTE         |
|-------------------------------------------------------|--------------------|
| <b><i>M. tuberculosis Complex</i></b>                 |                    |
| <i>M. tuberculosis</i>                                | Bazen patojen      |
| <i>M. africanum</i>                                   | Bazen patojen      |
| <i>M. bovis</i>                                       | Bazen patojen      |
| <i>M. ulcerans</i>                                    | Bazen patojen      |
| <b>Runyon Grup I ( Yavaş üreyen fotokromojenler)</b>  |                    |
| <i>M. kansasii</i>                                    | Kesin patojen      |
| <i>M. marinum</i>                                     | Kesin patojen      |
| <i>M. simiae</i>                                      | Kesin patojen      |
| <i>M. asiaticum</i>                                   | Kesin patojen      |
| <i>M. intermedium</i>                                 | Kesin patojen      |
| <b>Runyon Grup II (Yavaş üreyen skotokromojenler)</b> |                    |
| <i>M. szulgai</i>                                     | Genellikle patojen |
| <i>M. scrofulaceum</i>                                | Bazen patojen      |
| <i>M. xenopi</i>                                      | Bazen patojen      |
| <i>M. lentiflavum</i>                                 | Bazen patojen      |
| <i>M. interjectum</i>                                 | Bilinmiyor         |
| <b>Runyon Grup III (Yavaş üreyen non-kromojenler)</b> |                    |
| <i>M. avium</i>                                       | Kesin patojen      |
| <i>M. intracellulare</i>                              | Kesin patojen      |
| <i>M. genavense</i>                                   | Kesin patojen      |
| <i>M. haemophilum</i>                                 | Genellikle patojen |
| <i>M. malmoeense</i>                                  | Genellikle patojen |
| <i>M. shimoidei</i>                                   | Bazen patojen      |
| <i>M. celatum</i>                                     | Bazen patojen      |
| <i>M. branderi</i>                                    | Bazen patojen      |
| <b>Runyon Grup IV (Hızlı üreyenler)</b>               |                    |
| <i>M. fortuitum</i>                                   | Bazen patojen      |
| <i>M. chelonae</i>                                    | Bazen patojen      |
| <i>M. abscessus</i>                                   | Bazen patojen      |
| <i>M. mucogenicum</i>                                 | Bazen patojen      |
| <i>M. peregrinum</i>                                  | Bazen patojen      |

#### 2.5.2. Mycobacterium'ların Antijenik Yapısı

Mikobakteriler bir plazma membranı ile çevrili sitoplazma ve bunları çevreleyen lipitten zengin bir hücre duvarından oluşmuştur. Mikobakteriler, karmaşık yapılı tek hücreli organizmalar olup sitoplazmaları çözünabilir ve hücre duvarında lipitlere bağlı çözünemez antijenik yapılara sahiptir. Şimdiye kadar bilinen antijen sayısı 90 kadardır. Bunlardan sitoplazmada ve çoğu hücre duvarında bulunan;

mikolik asit, Wax D, fosfolipitler, mikosid gibi lipid antijenleri yüksek performanslı gaz-likid kromatografisi ile saptanabilir. Polisakkarid II antijenleri ise serolojik aktiviteye sahiptir. Protein antijenleri 6 grupta incelenir.

1. Sitoplazmik proteinler
2. Membranla ilişkili proteinler
3. Peptidoglikanla ilişkili proteinler
4. Dış hücre duvarı proteinleri
5. Isı şok proteinleri
6. Salınan proteinler

Konakçı bağışıklık yanıtının oluşmasında katkısı bulunduğu anlaşılan ilk mikobakteriyel protein antijenleri, ısı şok protein ailesi üyesidir.

*Isı şok proteinleri:* Yüksek ısı ile karşılaşma koşullarında sentezlendikleri için, bu proteinlere ısı şok proteinleri denilmektedir. Bu proteinlerin en önemli fonksiyonunun, hücre içi diğer proteinlerin translokasyonu ve katlanmasında, “moleküler refakatçi” rolü oynamaları ve polipeptid zincirini bağlama proteinleri olarak işlev görmeleri olduğu sanılmaktadır<sup>31</sup>. Bu grup içinde yer alan 65K antijeni, mikobakterilerin önemli immunoreaktif proteinlerinden biridir. Bu antijen, mikobakterinin çeşitli suşlarından ortak olan nonspesifik epitoplar gibi mikobakteriye tür özelliği veren spesifik epitoplar içerir. Pürifiye 65K antijeni, mikobakteri ile infekte deney hayvanlarında kuvvetli gecikmiş tipte hipersensitiviteyi sağlar. Isı şok proteinlerin bir özelliği de, bu proteinlerdeki aminoasit sıralarının (%50’den fazlası), tüm evrim sürecinde yüksek düzeyde korunmuş olmasıdır<sup>27-29</sup>.

Isı artışı veya çevresel stres ile sentezlerinde artış olur. Koruyucu, refakatçi proteinler oldukları, aynı polipeptid zincirini bağlayabildikleri ve immünodominant işlev gördükleri belirlenmiştir. Molekül ağırlığı 65 kD olan GroEL ve 12 kD olan GroES, mikobakteriyel ısı şok proteinleri içinde en bilinenleridir<sup>30,31</sup>.

*Aktif olarak salınan proteinler:* Ağırlıkları 23–30 kD kadardır. Enfeksiyonu takiben tanınan ilk proteinler oldukları için lipoproteinler ve ısı şok proteinleri ile birlikte araştırmacıların özel ilgi odağı olmuştur. Grubun en önemli elemanı antijen 85 kompleksidir; bu kompleksin ayrı genler tarafından kodlanan ancak çapraz reaksiyon veren 85A, 85B ve 85C bileşenlerinden oluştuğu gösterilmiştir. HücreSEL ve humoral bağışık cevap uyarıcısıdır, koruyucu bağışıklığın gelişmesinde ve komplikasyonlarda rolleri olduğu ileri sürülmüştür. Fibronektine bağlanma yetenekleri sayesinde, patojen ile konak organizma arasında iletişim sağladıkları düşünülmektedir<sup>31</sup>.

*Lipoproteinler:* *M. tuberculosis*’ın çözünebilir ekstraktlarının bol miktarda protein içerdiği saptanmış olup; bunlardan 38 kD’luk antijenin *M. tuberculosis* için oldukça spesifik bir antijen olduğu kabul

edilmiştir. Lipoproteinlerin, beslenme ve besin taşınması, fosfat taşınması, bağışık yanıtta hedef oluşturma gibi işlevleri saptanmıştır<sup>31</sup>.

*Süperoksit dismutaz*: 23 kD ağırlığındadır. Bakteriyi, toksik reaktif oksijen ürünlerinden koruyarak, fagozomdan veya hücre dışında oksidatif strese karşı koyma yeteneği sağlar<sup>31</sup>.

### 2.5.3 *Mycobacterium*'un Morfolojisi

*Mycobacterium*, aerop, sporsuz, kapsülsüzdür, flagella veya miçelleri bulunmaz, hareketsizdir. 0,2-0,6 µm eninde ve 1-10 µm boyunda, ince uzun, düz veya hafif kıvrık basillerdir. *M. tuberculosis* ekzotoksin veya endotoksin bulundurmaz, yavaş ürer, niasin üretir, nitratı indirger, az miktarda ısıya duyarlı katalaz üretir, İzoniazide dirençli suşlar katalaz üretmez<sup>31</sup>. Bazen dallanmış ve uzun filamentöz şekillerde, bazen kok formunda olabilirler. Middlebrook 7H9 gibi besiyerlerinde kord oluşturma söz konusudur. Besiyerinde oluşturdıkları kolonilerden yapılan preparatlarda ise gruplar şeklinde görülürler. İçerdikleri polimetafosfat granüllerine bağlı olarak basil, kendisinden daha koyu boyanmış boncuklu veya ince bantlar içeren şekillerde de görülebilir ve spor, kapsül, flagel veya miçelleri bulunmaz<sup>24</sup>. *M. tuberculosis*, *M. bovis*'e göre daha uzun ve silindirik<sup>20,24</sup>.

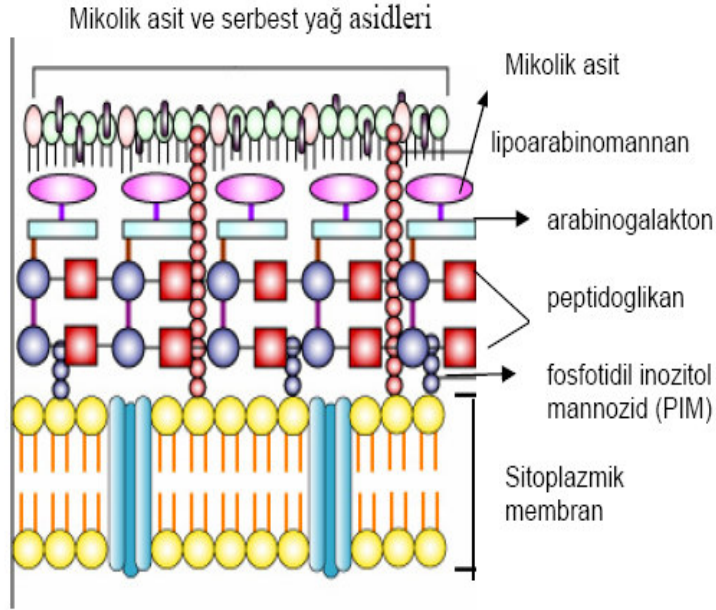
Türlerin çoğunluğu toprak ve sularda serbest yaşarlar. “*M. tuberculosis* kompleksi” ve *M. leprae* gibi türlerin esas yaşam alanları, insanlar ve sıcakkanlı hayvanların infekte dokularıdır<sup>20</sup>.

*M. tuberculosis* ve diğer mikobakteriler biyolojik olarak Gram pozitif bakterilere benzerlik gösterirler. Özellikle çok tabakalı peptidoglikan içeren hücre duvarı Gram pozitif bakteriler gibidir. Ancak diğer Gram pozitif bakterilerde genel olarak peptidoglikan tabaka ile ilişkili olan moleküller proteinler ve polisakkaridler iken, mikobakterilerde lipidlerin olmasıdır. Hücre duvarının %60'ını oluşturan lipidler arasında başlıcaları; mikolik asitler, mumsu madde, fosfolipidler, açılmiş trehalozlar bulunur<sup>32</sup>. *M. tuberculosis* hücre duvarının en çarpıcı özelliği içerdiği çok miktardaki mikolik asitlerdir. Bunların çoğu alttaki arabinogalaktana, bu da peptidoglikana kovalent bağlarla bağlıdır. Minnikin 1982'de mikolik asit zincirlerinin hücre yüzeyine dik olarak yerleştiğini ve iç kısımda asimetric bir tabaka oluşturduğunu göstermiştir. Bu yapının dışında ise kısa veya orta zincirli hidrokarbonları içeren polar lipidlerin bulunduğu bir tabaka vardır<sup>33</sup>.

Hücre duvarı alttaki yapılara mekanik destek olup dış ortamdan korunmayı sağlar. Hücre duvarının altında plazma zarı vardır. Plazma zarı, osmotik korunma ile iyonların ve diğer moleküllerin transportunda görevlidir. Mikobakterilerin plazma zarında lipoarabinomannan (LAM) ve lipomannan (LM) polisakkarileri ve

fosfotidil inozitol mannozid (PIM) vardır<sup>18</sup>. Bakteri duvarının şeklini oluşturan yapılar peptidoglikan tabakasının yapısında yer alır. Peptidoglikan tabakasına fosfodiester bağlarıyla bağlanmış olan dallı zincirli polisakkarid yapı arabinogalakten içermektedir. Bunun distal uçları yüksek moleküler ağırlıklı yağ asitleri olan mikolik asitler ile esterleşir. Mikolik asitlerin büyüklüğü ve kimyasal yapılarının mikobakteri türüne özgü olması, bunların taksonomik ve tanısal önemini açıklamaktadır<sup>32</sup>. Mikolik asitler, 2-alkil dallanmış 3-hidroksi yağ asitleri olup 70–90 karbonludurlar. Dallanan kısım genellikle 24 karbon atomu uzunluğundadır ve basit bir alkil zinciridir. *M. tuberculosis*'de ara zincirde siklopropil, metoksil veya keto ve metil grupları bulunmaktadır. Bu farklılık mikobakterilerin zarf modellerini açıklamakta önemlidir. Çözünmez nitelikteki başlıca 3 makromolekül olan peptidoglikan, arabinogalakten ve mikolat mikobakterilerde hücre duvarının iskeletini oluştururlar. Bu iskelet yapı ile ilişkili olan çok sayıdaki lipid ve glikolipid dışında proteinler de vardır. Bunlar, mikobakteri türleri veya grupları arasında farklılık gösterir ve ultrastrüktürel görünimleri de oldukça özeldir<sup>33,34</sup>. Hücre duvar yapılarından pek çoğu, basillerin virülansında ve patogeneğinde önemli rol oynar. Bu yapılar arasında mikolil-arabinogalakten-peptidoglikan kompleksi (mAGP), lipoarabinomannan (LAM), lipomannan (LM), PIM, sulfatidler (SL), trehalozo 6,6' dimikolat (kord faktörü), diğer açillenmiş trehalozlar, fenolik glikolipidler, lipooligosakkaridler sayılabilir<sup>35</sup>.

Mikobakteri hücre duvarının önemli bir özelliği, kapsüller lipidlerin ve dış lipid matriks ile mikolilarabinogalaktenin bütünlüğüdür. Mikobakterilerin fosfolipidleri her zaman fosfodiaçilgliseroldür. Bunlar arasında en sık görüleni fosfatidilgliserol, difosfatidilgliserol, fosfatidiletanolamin ile aralarında en değişik ve en özellikli olan PIM'dir. Açillenmiş trehalozlar virülans ile doğrudan ilişkilidir. Trehalozo 6.6'dimikolat'ın sitokin bazlı olayları indüklediği bildirilmiştir. Bunlar arasında sistemik toksisite, antitümoral aktivite, granülom oluşturuucu aktivite, makrofajlardan kemotaktik faktörlerin salgılanması sayılabilir. Diğer trehaloz esterlerinden mikolipenik asitler, 2,3-di-o-açil trehalozlar da virulan suşlarda saptanmışlardır. Hücre yüzey lipidlerinden heterojen bir grubu oluşturan mikozidler, türe, hatta suşa özgüdürler. Bunlar, serotip, koloni morfolojisi, ayrıca virulans gibi özelliklerin belirleyicisidirler ve bakteriyofaj reseptör bölgesi gibi iş görürler. Peptidoglikolipidler (mikozid c) ve fenolik glikolipidler (fenol, fitoserol dimikoserozatlar) olmak üzere başlıca iki tipi vardır. Birinci grup mikoserozik asid, şekerler ve amino asitleri içerir, ikinci grup ise farklı olarak amino asit içermez<sup>36</sup>.



**Şekil 3: *M. tuberculosis*'in hücre duvar yapısı<sup>37</sup>.**

Koch, tüberkülini bulduktan sonra günümüze kadar geçen sürede mikobakterilerde 50 kadar protein antijeni daha ortaya atılmış, bunlardan çoğu tanımlanmış ve 20 kadarının nükleotid dizileri belirlenmiştir<sup>38</sup>. En ünlü *M. tuberculosis* antijeni tüberkülin'dir. Koch 1981 de, *M. tuberculosis*'in ürettiği besiyeri ortamındaki maddeleri saflaştırıp ısıyla etkisizleştirip "old tuberculin" (OT) olarak tanımlanan ürünü elde ettiğinde, başlangıçta bu ürünün tüberküloz tedavisinde kullanılabileceğini düşündüğü ancak sonradan, OT'nin yeterince saf olmaması nedeniyle, uygulandığında çeşitli istenmeyen reaksiyonlara neden olması, Seibert ve Munday'ın 1932'de OT'nin amonyum sülfat çökeltisini hazırlayarak tüberkülinin saflaştırılmış türevini (Tuberculin Purified Protein Derivative, PPD) üretmelerine yol açtığı, günümüzde de bundan tanısal ve epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak yararlanıldığı vurgulanmaktadır<sup>22</sup>.

Proteinler, sitoplazma, hücre membranı veya hücre duvarı ile ilişkili olabildikleri gibi mikobakterilerin bulundukları ortama da salgılanabilirler. 1992'de Young'ın fonksiyonları bilinen ve bilinmeyen çok sayıda mikobakteri proteinini derlediği bildirilmiştir. Buna göre, başlıca sitoplazmik proteinler olarak 65 kDa (GroEL) ve 71 kDa (Dnak) büyüklüğündeki ısı şok proteinleri, bağlayıcı protein olarak aromatik amino asitlerin sentezinde işlev gören PhoS, 40 kDa'luk L-alanin dehidrogenaz, tuf geninin kodladığı elongasyon faktörleri sayılabilirler. Membran ile ilişkili olan proteinlerin araştırılmasında ilk olarak ayrıştırılan 19 kDa protein olmuştur. İmmünojen nitelikteki bu protein tüm virülan *M. tuberculosis* suşlarında saptanmıştır. Lipoproteinler de hücre yüzeyi ile ilişkili olan ve iyi bilinen yapılardır. 38 kDa proteininin

sentezi fosfat eksikliğinde arttığı için fosfat sentezinde rol oynadığı ileri sürülmüştür. “Antijen 85 kompleksi” olarak tanımlanan, mikobakterilerin salgıladığı başlıca proteinlerin, bakteri yüzeyi ile de ilişkili olabildiği bildirilmiştir. Bu kompleksi oluşturan üç proteinin 85 A (MP44, 31 kDa), 85B (MP59, 30 kDa) ve 85C (MP45, 31.5 kDa) olduğu, bunların homolog ancak ayrı üç gen tarafından kodlandığı ileri sürülmüştür<sup>20,23</sup>. Hücre dışına salgılanan önemli bir diğer protein süperoksid dismutaz, aktif makrofajlar tarafından salgılanan süperoksid radikallerini etkisizleştirerek konakçı yanıtını zayıflatır. Son zamanlarda *M. chelonae*’de saptanmış olana benzer özellik gösteren porin proteinlerinin *M. tuberculosis*’de saptandığı bildirilmiştir<sup>36</sup>.

## 2.6 Klinik Bulgular<sup>13</sup>

Tüberküloz basilinin akciğerlere yerleşip çoğalabilmesi için alveollere kadar ulaşması gerekmektedir. Bu da ancak hasta kişiden solunum ile havaya saçılan damlacık çekirdeklerinde asılı halde bulunan basillerle mümkün olabilmektedir.

Büyük partiküller üst solunum yollarında tutulurken, küçük partiküller alveollere ulaşır.

Basiller alveoldeki makrofajlar tarafından alınır ve makrofaj içinde çoğalırlar. Bir kısmı lenfatiklerle lenf bezelerine giderler ve kan dolaşımı ile akciğer apekslerine, beyine, kemiklere, böbreklere ve diğer organlara yayılırlar. Yaklaşık 2 hafta-2 ayda bağışıklık sistemi devreye girer ve tüberküloz basilinin yayılmasını engeller.

Tüm tüberküloz olgularının %80-90’ında hastalık akciğerlerde ortaya çıkar. Diğer organ tüberkülozlarının bir çoğu da akciğerlerdeki tüberküloz enfeksiyonunu takiben meydana gelir.

Tüberküloz hastalığının sık görüldüğü diğer organlar, lenfatik sistem, plevra, santral sinir sistemi, genitoüriner sistem, kemikler ve eklemlerdir; ya da yaygın olarak tüm organları tutabilir ki buna milier tüberküloz (ya da dissemine tüberküloz) denilir.

### **Akciğer tüberkülozu**

Akciğer parankimini tutan TB için efüzyonu ya da toraks içinde akciğer dışı tüberküloz kabul edilir.

### **Akciğer dışı tüberküloz (AD-TB)**

Akciğer parankimi dışındaki organlardan alınan örneklerde ARB gösterilebilen ya da tüberkülozla uyumlu histolojik ve klinik bulgusu olan hastalar.

### **Akciğer ve akciğer dışı tüberküloz**

Akciğer TB ve AD-TB birlikte ise bu grup hastalarda her iki tutulumun da olduğu belirtilir; akciğer dışı tutulan organ(lar) da belirtilir. Bu grup hastalar, DSÖ’ne, akciğer TB olarak bildirilmektedir.

## 2.7 Mycobacterium tuberculosis’ın Tanısı

Tüberkülozun erken tanısı için en önemli nokta klinik kuşkudur. Öksürük, ateş, gece terlemesi, kilo kaybı, halsizlik ve hemoptizi tüberkülozu düşündüren belirtiler olmakla birlikte hiçbir tüberküloza özgü değildir. Tanı yaklaşımı, en iyi öykü ve fizik inceleme ile başlamalı, ardından çeşitli testler uygulanmalıdır<sup>18</sup>.

Tüberküloz tanısında güvenle kullanılabilecek tek bir tanı metodu bulunmadığı için tanı; klinik, mikrobiyolojik, patolojik ve radyolojik bulguların birlikte değerlendirilmesi ile konabilmektedir. Hızlı tanı yöntemlerinin, rutin kullanıma girebilmesi için duyarlı ve özgül olduklarının kanıtlanması ve maliyetlerinin düşürülmesi gerekmektedir<sup>30</sup>.

**Tablo 2. Tüberküloz tanısında mikroskopi materyalleri<sup>17</sup>**

| Mycobacterium için Çalışılan Laboratuvar Örnekleri |                           |
|----------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>Steril Örnekler</i>                             | <i>Kontamine Örnekler</i> |
| Beyin Omurilik Sıvısı                              | Balgam                    |
| Kemik                                              | Bronkoalveolar Lavaj      |
| Biyopsi                                            | Mide Yıkama Suyu          |
| Kan                                                | Dışkı                     |
| Gastrik Lavaj                                      |                           |
| İdrar                                              |                           |

*M. tuberculosis*’ın tanı yöntemleri aşağıda gösterilmektedir<sup>3,12</sup>.

### Geleneksel İndirekt Tanı Yöntemleri:

- Tüberkülin deri testi
- Görüntüleme yöntemleri
- Sıvı ve salgıların analizi
- Ampirik tedavi

### Geleneksel Direkt Tanı Yöntemleri:

- Tüberküloz basilinin bakteriyolojik tanısı:
  - Direkt yayma yöntemi
  - Dekontaminasyon ve konsantrasyon yöntemi
  - Konvansiyonel kültür teknikleri

- b) Histopatolojik inceleme

#### Yeni İndirekt Tanı Yöntemleri:

- a) Serolojik testleri
- b) Adenozin Deaminaz (ADA) düzeyi ölçümü
- c) Lizozim düzeyi ölçümü

#### Yeni Direkt Tanı Yöntemleri:

- a) Radyometrik kültür yöntemleri (BACTEC)
- b) Gaz kromatografisi-kitle spektrometrisi
- c) Genetik ve immünolojik problemler
- d) Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)
- e) Ligaz zincir reaksiyonu
- f) DNA parmak izi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- g) Luciferase reporter assay

#### İdentifikasyon ve Tiplendirmede kullanılan yöntemler

- a) Üreme sıcaklığı
- b) Pigment oluşumu
- c) Katalaz deneyi
- d) MacConkey agarda üreme
- e) Niasin deneyi
- f) Pyrazinamidase deneyi
- g) %5'lik NaCl'lü ortamda üreme
- h) Tellürit redüksiyonu
- i) Tween 80 hidrolizi
- j) Üreaz deneyi
- k) Nitrat redüksiyonu deneyi
- l) Amino sülfataz deneyi
- m) Antimikobakteriyel ilaç duyarlılığının saptanması

#### 2.7.1 Geleneksel İndirekt Tanı Yöntemleri:

- a) *Tüberkülin Deri Testi*

Deri testi, *M. tuberculosis* ile enfekte olduğunu gösterir, hastalığı göstermez. Tüberküloz basiline bağlı, geç tip aşırı duyarlılık sonucu pozitif olur. Çocuk tüberkülozunda tanıya yardımcı olur. Erişkinde, tanıdaki değeri düşüktür. Bazı durumlarda tüberkülozun bazı türleri, HIV ile ilave enfeksiyon tüberküloz hastalığının olmasına karşın deri testi alerjik olabilir. BCG aşısı ile de pozitifliği arttığı için BCG aşısının rutin uygulandığı ülkemizde genellikle pozitif bulunur<sup>39</sup>.

#### *b) Görüntüleme Yöntemleri:*

Akciğer grafilerinde; üst lobların apikal, posterior ve alt lobların süperior segmentlerinde infiltrasyon, kavite ve fibrozis tüberkülozu düşündürür. Ancak hiçbir radyolojik görüntü tüberküloza özgü değildir<sup>40</sup>.

#### *c) Sıvı ve salgıların analizi:*

Daha çok akciğer dışı tüberküloz tanısı için kullanılır<sup>39</sup>.

#### *d) Ampirik tedavi:*

Klinik ve radyolojik bulguların tüberküloz düşündürdüğü, ancak kanıtlanamadığı durumlarda hastaya 2 ay süre ile anti-tüberküloz tedavi verilir, ardından hastadaki klinik ve radyolojik düzelme değerlendirilir. Olumlu sonuç tanıyı kanıtlar<sup>12</sup>.

### 2.7.2 Geleneksel Direkt Tanı Yöntemleri<sup>39-42</sup>:

#### *a) Tüberküloz basilinin bakteriyolojik tanısı:*

Tüberkülozda bakteriyolojik incelemeler uygulama kolaylığı, ucuzluğu, yüksek sayılabilecek sensitivite ve spesifite nedeniyle tanısal değerlendirmede temeldir.

Tüberküloz tanısı koymada en önemli yöntem bakteriyolojik olarak basilin varlığının gösterilmesidir.

Direkt tanı yöntemlerinin başında aside dirençli basilin gösterilmesi ve kültürde üretilmesi gelmektedir<sup>43</sup>.

İncelenecek materyal tutulan organa göre alınmalıdır. Tüberküloz basilinin mikroskopik yayma preparatlarında incelenmesi için 2 yöntem vardır. Bunlar; direkt yayma yöntemi ile dekontaminasyon ve yoğunlaşma yöntemidir<sup>44</sup>.

- *Direkt yayma yöntemi;*

Balgamın ya da patolojik materyalin hiçbir işleme tabi tutulmadan lama yayılması ve doğrudan boyanarak mikroskopa basil araştırılması yöntemidir<sup>17</sup>

- *Dekontaminasyon ve konsantrasyon yöntemi:*

Materyalin işlendikten sonra yoğunlaştırılarak elde edilmiş çökeltinin boyanarak mikroskopa basil araştırılması yöntemidir<sup>17</sup>.

Birçok klinik örnekte bol miktarda flora bakterisi bulunmaktadır. Uygun olarak inhibe edilmediklerinde hızla üreyen bu kontaminan bakteriler, çok daha yavaş üreyen mikobakterilerin üremesine fırsat bırakmazlar. Kontaminan mikroorganizmaların yok edilmesi, *M. tuberculosis* ekildiği kültür ortamından beslenmesini engelleyen doku, serum ve diğer protein yapıdaki organik döküntülerin sulandırılması için dekontaminasyon ve yoğunlaştırma işlemleri uygulanmaktadır<sup>17</sup>.

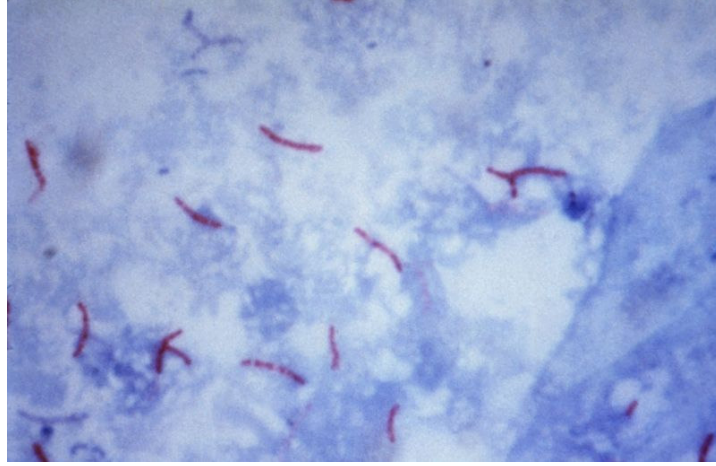
- *Bakterilerin Ziehl-Neelsen ile boyanması:*

Üzerine materyal yayılan lam alevde tespit edilir. Üstünü tamamen örtecek şekilde karbol fuksin boyası konur. Kaynatmadan alttan 3–4 dakika ısıtılır. Isıtma sırasında boya eklenerek, kuruma önlenir. Sonra boya dökülür. Su ile yıkanır. Asit-alkol (%3 HCl, %97 alkol) ile renk giderme işlemi sonunda sadece *M. tuberculosis* boyayı dışarı vermez ve kırmızı renkte kalır. Preperattaki diğer oluşumların boyanması için metilen mavisi eklenilerek 1-2 dakika beklenir. Su ile yıkanır. Boyanmış yaymalar 100x immersiyon objektifinde incelenir. Kinyoun işleminde karbol-fuksin fenolle, kaynatmadan hücre duvarına penetre edilir. Bu yöntemlerle boyanmış preparatlarda *M. tuberculosis* basilleri mavi zemin üzerinde kırmızı çomakçıklar olarak görülür<sup>30</sup>.

Direkt incelemede *M. tuberculosis* görülmesi tanıyı kesinleştirmez. Çünkü aside dirençli başka basiller olabilir. Tüberkülozun kesin tanısı kültür ortamında basilin üretilmesi ile konur. Kültür aynı zamanda basilin patojenliğini, tip tayinini, ilaç duyarlılık testi yapılmasını sağlar. Yayma negatif hastaların kültürlerinde üreme saptanması ile mikroskopik tetkike ek olarak %15-20 hastada bakteriyolojik tanı konulabilir<sup>30</sup>.

**Tablo 3. Mikroskopik değerlendirmenin önemi<sup>40</sup>**

|                    |                           |                                |
|--------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Duyarlılık         |                           | %25-65(Kültür Pozitif vakalar) |
| Özgüllük           |                           | > 98%                          |
| Sınırlayıcı faktör |                           | 5-10 x 10 <sup>3</sup> ARB/ml  |
| Toplam verim       |                           | > %95                          |
| Yakalanma şansı    | 1 <sup>ci</sup> ARB yayma | %80-82                         |
|                    | 2 <sup>ci</sup> ARB yayma | %10-14                         |
|                    | 3 <sup>cü</sup> ARB yayma | %5-8 +                         |



**Şekil 4: *Mycobacterium tuberculosis*' in mikroskop altında görüntüsü<sup>45</sup>**

- *Geleneksel kültür teknikleri:*

Tüberküloz tanısı için altın standart kültüredür. Balgamin milimetresinde 10–100 canlı basilin bulunması kültürde üreme için yeterlidir. Ancak *M. tuberculosis* yavaş ürer. Sonuç alabilmek için 6–8 hafta beklemek gerekir<sup>44</sup>.

*M. tuberculosis* üreme ve büyüme faktörü olarak spesifik bir organik bileşiğe gereksinim göstermez. Ancak, klinik örneklerden izolasyonu için zengin besiyeri ortamlarının kullanılması gerekmektedir. Besiyeri ortamındaki karbon kaynakları gliserol, pirüvat ve glikozdur. Azot ise asparajin, aspartik asit, glutamin, glutamik asit veya amonyum tuzları ile karşılanır. Zorunlu aerob bir bakteri olduğundan *M. tuberculosis* basilinin üremesi için oksijen gereklidir CO<sub>2</sub> üremeyi stimüle ettiğinden kültürlerin %5–7 karbondioksit ile üreme şansını artırır<sup>46</sup>.

Besiyerindeki yumurta sarısı veya oleik asit ile sağlanan yağ asitleri de üremeyi stimüle eder. Oleik asit yüksek konsantrasyonunda (>%1) toksik olduğundan albümin ile nötralize edilmelidir. Sülfür, fosfor, sodyum, potasyum, magnezyum ve diğer iz elementler (çinko, manganez, bakır) genellikle besiyerindeki ek zenginleştiricilerdir. Mikobakterilerde sideroforlar demir depolarıdır. Besiyeri içeriğindeki ferrik amonyum sülfat, demir sağlayan temel yapıdır. Çoğu besiyerinde bu temel yapılar dışında, piridoksin, biotin, sodyum sitrat, katalaz da bulunabilir<sup>46</sup>.

Agar bazlı besiyerlerinin yumurtalı besiyerlerine göre bazı üstünlükleri vardır. Öncelikle, transpozan yapıda olmalarından dolayı mikroskopik boyuttaki koloniler bile saptanarak erken dönemde, ortalama 10–12 günde tanı konulabilir. Bunun için agarlı besiyerinin ince dökülmesi ve mikroskopta x40 büyütme ile incelenmesi önerilmektedir<sup>47</sup>.



**Şekil 5. *M. tuberculosis*'in katı kültürdeki koloni morfolojisi<sup>48</sup>**

En yaygın kullanılan Middlebrook 7H10 ve 7H11 besiyerleridir. Bunların içine besiyerini zenginleştirici olarak oleik asit, albümin, dekstroz ve katalaz karışımı konularak kullanılır. Katalazdan dolayı hasar gören mikobakterilerin hızla canlanmasına yardımcı olur. Oleik asit ve diğer bileşiklerden açığa çıkan toksik ürünler de albümin tarafından bağlanır. Middlebrook 7H10 agar izolasyonda, Middlebrook 7H11 agar ise antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılır. Antibiyotikler agar katılaşmadan önce besiyerlerine katıldıkları için inaktivasyonları söz konusu değildir. Middlebrook 7H11'de 7H10'dan farklı olarak kazein vardır. Kazein, izoniazide dirençli mikobakterilerin izolasyon şansını artırır<sup>51</sup>. Agar bazlı besiyerlerinin bazı dezavantajları vardır. Bunlar arasında raf ömrünün sınırlı olması ve hazırlanırken besiyerinin içine zenginleştirici oleik asit ve diğer bileşiklerden açığa çıkan toksik ürünler konulduğundan maliyetinin yüksek olması sayılabilir<sup>47</sup>. Bu tip besiyerlerinin yüksek ısı ve ışık alması veya buzdolabında dört haftadan uzun süre bekletilmesi sonucunda bozulduğu ve ortama mikobakterilerin üremesini engelleyici bir madde olan formaldehitin çıktığı bildirilmektedir. Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H10, 7H11 besiyerlerine eklenen çeşitli antibiyotiklerle selektif besiyerleri elde edilir. Bu besiyerleri istenmeyen bakteriyel ve fungal kontaminantların üremesini engeller. Günümüzde, Gruft tarafından tanımlanmış olan, penisilin, nalidik asit ve RNA içeren Löwenstein-Jensen'in yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Mikobakterilerin üretilmesinde selektif ve non-selektif besiyerleri birlikte kullanılmıştır<sup>49</sup>.

Sıvı besiyerleri primer izolasyon veya pasaj yapılması amacıyla kullanılır. Middlebrook 7H9 en sık kullanılan bazal sıvı besiyeridir. Bunun yanı sıra septi-check, BACTEC, 460 TB gibi kullanılan hazır sıvı besiyerleri ortamı ve bunların kullanıldığı ticari manuel veya

otomatik sistemler de bulunmaktadır. Septi-check 20 ml modifiye Middlebrook 7H9 besiyerinin, inokülasyondan sonra son konsantrasyonu %5-8 olacak şekilde CO<sub>2</sub> doldurulduğu kapaklı bir tüp ile modifiye Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H11 ve çikolata agarın birlikte yer aldığı ayrı bir plastik tüpten oluşan bifazik bir sistemdir. İşlenen örnek, sıvı besiyeri tüpüne ekilir ve tüp vidalanır. 24 saat sonra tüp ters çevrilerek katı besiyerine subkültürü yapılmış olur. Geleneksel yöntemlerden daha kısa sürede, ortalama 10–14 günde izolasyonun gerçekleştiği kabul edilmektedir. MGIT, Middlebrook 7H9 buyyon, kazein pepton ve gliserol içeren hazır besiyeri ortamıdır. Besiyeri zenginleştirici sıvı (oleik asit ve diğer bileşiklerden açığa çıkan toksik ürünler) ve polimiksin B, nalidik asit, trimetoprim, ve azlosilinden oluşan, kontaminant bakterilerin üremesini engelleyen antibiyotik sıvısı (PANTA) ile birlikte satılmaktadır. Tüpün dibinde bulunan oksijene duyarlı floresans indikatörü ile üremenin erken dönemde saptanabildiği ileri sürülmektedir<sup>46,49</sup>.

#### 2.7.2.1 Kültürlerin Değerlendirilmesi

Kültürler ilk 3–5 gün içinde bakteri kontaminasyonu veya hızlı üreyen mikobakteriler açısından, sonrasında ise haftada iki gün üremenin kontrolü açısından değerlendirilmelidir. Rutin olarak kültürlerin pozitif olarak değerlendirilip atılması için ortalama 6–8 haftalık inkübasyon önerilmektedir<sup>17,12</sup>. ARB pozitif örnekte genellikle 2–4 hafta içinde üreme gözlenir. Ancak mikroskopik incelemede ARB pozitif örneklerin kültürlerinde bu süre içinde üreme gözlenmez ise ek olarak dört hafta daha bekletilmesi uygundur. Kültürlerin değerlendirilmesinde üreme hızı, pigmentasyon, koloni morfolojisi ve koloni sayısı üzerinde durulmalıdır. Besiyerinde üreyen kolonilerden yapılan preparatlar ARB ile boyanmalı ve mikroskopik olarak mikobakterilerin üremesi doğrulanmalıdır. Kolonilerden yapılacak çeşitli biyokimyasal ve fenotipik testler yardımıyla da tür ayrımı yapılabilir. *M. tuberculosis* kolonisi “siğil” şeklinde diye tanımlanır. Bunlar kuru, mat, yüzeyi pürüklü, küçük kolonilerdir. Fotokromojenler olarak sınıflandırılan mikobakteriler ışık altında sikotokromojenler ise karanlıkta pigment yaparak renkli koloniler oluştururlar<sup>12,46</sup>.

**Tablo 4. *Mycobacterium tuberculosis*'in üretilmesinde kullanılan besiyerlerinin sınıflandırması<sup>12</sup>**

|                                             |                                                                                                       |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1) İçerikleri yönünden</b>               | a) Sentetik besiyerleri: Sauton, Long .                                                               |
|                                             | b) Yarı sentetik besiyerleri:Yumans, Dubos, Middlebrook .                                             |
|                                             | c) Kompleks besiyerleri: Yumurtalı, Löwenstein-Jensen, Ogawa, Amerikan Trudeau besiyerleri .          |
| <b>2) Görünüşleri ve sunuş şekline göre</b> | a) Katı Besiyerleri; Löwenstein-Jensen, Middlebrook, Amerikan Trudeau besiyerleri .                   |
|                                             | b) Sıvı besiyerleri: Sauton, Youmans, Sula, Middlebrook.                                              |
|                                             | c) Karışık besiyerleri: Gliserinli, patatesli buyyon, Kanlı Tarshis .                                 |
| <b>3) Kullanım amaçlarına göre:</b>         | a) Primer kültür: "Basil ayırımı için" Löwenstein-Jensen, Amerikan Trudeau, agarlı Middlebrook, Ogawa |
|                                             | b) Araştırma için: Üreme süresi ve şekli, antibiyogram, Youmans vasatı.                               |
|                                             | c) Üretim için besiyeri: Tüberkülin, BCG vs. için (Souton, Reid, Long)                                |

**Tablo 5. Kültür sonuçlarının DSÖ Kriterlerine Göre Değerlendirilmesi<sup>17</sup>**

|                  |                                                                                                                       |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ✓                | Eğer kültürde kontaminasyon var ise; derhal rapor edilir, yeni bir örnek istenir.                                     |
| ✓                | Eğer kültür pozitif ve üreyen materyal <i>M. tuberculosis</i> olarak tanımlanmış ise; klinisyene derhal rapor edilir. |
| ✓                | Dördüncü haftada kültürde üreme yok ise; ön rapor gönderilebilir.                                                     |
| ✓                | 8. haftada kesin rapor verilir, önceden verilen ön raporlar yok edilir. Hasta dosyasına son rapor yerleştirilir.      |
| • (-)            | : Üreme yok                                                                                                           |
| • Koloni sayısı  | : 1-19 koloni ürettiğinde koloni sayısı verilmelidir (örneğin;12 koloni)                                              |
| • (+)            | : 20-100 koloni                                                                                                       |
| • (++)           | : 100-200 koloni                                                                                                      |
| • (+++)          | : 200-500 koloni (genellikle birleşmiş koloniler şeklinde üreme)                                                      |
| • (++++)         | :500 koloniden daha fazla (birleşmiş koloni şeklinde üreme)                                                           |
| • Kontaminasyon: | Tüm besiyerlerinde kontaminasyon (kültürün tekrar edilmesi gerekir).                                                  |

*M. tuberculosis* kültürde beyaz ya da sarıya yakın renkte, pürüklü, kabarık ve düzensiz kenarlı koloniler oluşturur. Niasin testi pozitifdir. Üredikten sonra sodyum nitrat, nitrite redükte ederler. Oda ısısında katalaz aktiviteleri vardır. Bu özellikleri ile diğer mikobakteri türlerinden ayrılırlar<sup>50</sup>.

#### *b) Histopatolojik inceleme:*

Tüberkülozun klasik patolojik görüntüsü kazeifiye nekroz alanlarının bulunduğu granülomatöz dokudur<sup>27</sup>.

#### 2.7.3.Yeni İndirekt Tanı Yöntemleri

##### *a) Serolojik Testler:*

Gerek mikobakteri sıvı kültürü ortamlarında, gerekse doğrudan klinik örnekte, mikobakterilerin antijenlerinin immünolojik yöntemlerle (RIA-ELISA) saptanması, son yılların çalışma konularındandır<sup>39</sup>.

Serolojik testler, tüberküloz tanısında çeşitli sebeplerden dolayı yeterli duyarlılık ve özgüllüğü sağlayamamaktadır<sup>39</sup>.

b) *Adenozin Deaminaz (ADA) düzeyi Ölçümü:*

ADA, adenozinin inozine dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir; monositler, makrofajlar ve özellikle T lenfositler gibi çeşitli hücrelerin matürasyonu ve diferansiyasyonu için gereklidir. Çeşitli hastalıklarda, bu enzim düzeyinde yükselme olabilir. İlgili bölgelerin tüberkülozla tutulumunda plevral, perikardiyal ve beyin-omurilik sıvılarında ADA düzeyinde yükselme olduğu bildirilmiştir<sup>39</sup>.

c) *Lizozim Düzeyi Ölçümü:*

Bu bakteriyolitik protein, normalde serumda, aktive makrofaj ve monositlerle granülositlerde bulunur. Plevra tüberkülozunda, lizozim konsantrasyonunda ve plevra sıvısı/serum lizozim oranında yükselme olduğu bildirilmiştir<sup>39</sup>.

2.7.4 Yeni Direkt Tanı Yöntemleri:

a) *Radyometrik Kültür Yöntemleri (BACTEC)*

Middlebrook, Reggiardo ve Tigert özel bir ortamda *M. tuberculosis* üremesini saptayabilen otomatize radyometrik bir yöntem bulmuşlardır. Daha sonraları bu yöntem, ticari olarak geliştirilmiş bir cihaza (BACTEC) uyarlanmıştır<sup>3</sup>.

Bu yöntemde, eritme, dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemlerinden geçirilen klinik örnekler (balgam, mide sıvısı, idrar, kan, bronş lavajı, vücut sıvıları, doku vb.) Karbon 14 ile işaretlenmiş palmitik asit içeren kültür ortamına (Middlebrook 7H12 besiyeri) ekilir. Mikobakteriler üremeleri sırasında besiyerinde bulunan yağ asitlerini metabolize ederler ve bu sırada <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> oluşur. Ortaya çıkan <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> kültür kabının üzerinde toplanır. BACTEC aleti, içinde bulunan her bir kültür kabındaki <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>'in belirli aralarla radyoaktivitesini ölçer. Her bir kültür kabındaki 0–999 sınırları içinde sayı olarak saptanır. Bu sayılar büyüme indeksini gösterir. Eğer klinik örnekte mikobakteriler varsa büyüme indeksi artar, yoksa düşük olacaktır<sup>3</sup>.

BACTEC yöntemi ile klinik örnekte mikobakterilerin varlığı, geleneksel kültür yöntemlerine göre, çok daha erken sürede saptanır. BACTEC yöntemi ile üreme zamanı 4–8 gündür. Yine bu yöntem ile ilaç duyarlılık testleri 4–8 günde sonuçlanır. Böylece ortalama, ilk izolasyon, tür belirleme ve in-vitro duyarlılık, radyometrik yöntemle 14–21 günde elde edilir<sup>3</sup>.

Hızlı radyometrik yöntemin önemli avantajlarından birisi de tüberküloz tedavisinde kullanılan ve majör bir ajan olan pirazinamide karşı invitro duyarlılık testinin yapılabilmesidir<sup>3</sup>.

#### *b) Gaz Kromatografisi-Kitle Spektrofotometresi:*

Mikobakterilerin hücre duvarında çok miktarda lipit bulunur. Bazı lipit formlarının değişik kromatografik yöntemlerle belirlenmesi hızlı tanıda yararlı olabilir. Bu amaçla tuberkülostearik asit ve mikolik asit tayinleri kullanılmaktadır<sup>39</sup>.

İyon izlenimi metodunu kullanılmış, bu metot 0,6 pq gibi oldukça düşük tuberkülostearik asit düzeyini saptayabilir. Tek sakıncası tuberkülostearik asitin sadece *M. tuberculosis*'de değil tuberküloz dışı mikobakterilerde ve aktinomiçeslerin diğer üyelerinde de bulunmasıdır. Bu yöntem tuberküloz prevalansının yüksek olduğu ülkelerde yararlı olabilir. Pahalı cihazlara ve birbirini izleyen örnek analizlerine gereksinim göstermesi olumsuz yönüdür. *M. gordanae* dışında tüm mikobakterilerde üretilen bir yağ asidi olan tuberkülostearik asit, tuberküloz menenjitinin hızlı tanısında değerlidir<sup>39</sup>.

Mikobakteriye spesifik olan mikolik asidin saptanması da tanı yöntemi olarak tartışılmaktadır. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) ile mikobakteriyel kültürlerde bu madde belirlenebilmektedir. Bu yöntem için  $10^7$ – $10^8$  mikobakteri gereklidir<sup>39</sup>.

#### *c) Genetik ve İmmünolojik Problar*

Birbirini tamamlayıcı nükleik asit zincirlerinin, bir araya gelerek kalıcı çift zincir oluşturması esasına dayanır. En yaygın olarak kullanılan problar, radyoaktif izotopla işaretli tek zincirli High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) problarıdır. Bu problarla tanı konabilmesi için  $10^5$ – $10^8$  basil gereklidir. Bu nedenle klinik örneklerde yeterli sonuç alınamaz; çoğalmakta olan kültürlerde uygulanması anlamlıdır. Test edilen örnek sayısına göre 2–8 saatte işlem tamamlanmaktadır. Sensitivitesi %90' ın üzerinde spesifitesi %100' dür<sup>39,50</sup>

#### *d) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)*

Spesifik DNA dizilerinin, bir primer aracılığı ile yönlendirilen in vitro enzimatik amplifikasyonu yöntemidir. Bu teknik ile birkaç saat içerisinde spesifik DNA dizisinin bir milyondan fazla kopyası elde edilir. Klinik örnekteki 10–100 mikobakterinin nükleik asidi, PCR ile yeterince çoğaltılabilirse daha sonra özgül nükleik asit probları ile saptanabilir. Günümüzde, klinik örneklerde mikobakterilerin saptanması ve tip tayinlerinde, PZR teknolojileri kullanılmaktadır. Klinik çalışmalardan elde edilen ilk veriler, yayma pozitif akciğer tuberkülozlu hastalarda, PZR'ın yüksek tanısal bir duyarlılığa sahip olduğunu, fakat yayma negatif, kültür pozitif hastaların saptanmasında sorunlar bulunduğunu göstermektedir. Yayma pozitif ve kültür pozitif örneklerin

%88-95'inde, fakat yayma negatif kültür pozitif örneklerin sadece %57-71'inde PZR pozitifliği saptanmıştır. Buna ek olarak eski tüberküloz öyküsüne sahip hastalarda PZR'ın pozitif bulunduğu, PZR'ın canlı ve ölü basilleri ayırt edemediği gösterilmiştir<sup>39</sup>.

*e) Ligaz Zincir Reaksiyonu:*

Bu moleküler biyolojik yöntemde, enzim olarak DNA ligaz kullanılır. DNA ligaz iki DNA parçasını çift sarmal oluşturacak şekilde birleştirir. Bir nükleotidde bile mutasyon olsa bu yöntemle saptanabilecektir. Bu yöntem özellikle ilaç çalışmaları için umut vermektedir<sup>39</sup>.

*f) DNA parmak izi (Restriction Fragment Length Polymorphism)*

Restriksiyon endonükleazlar, DNA'yı belirli noktalardan kesen enzimlerdir. Enzimin tanıma bölgesi, klasik olarak 4–8 nükleotid arasında değişir. Enzim ile kesim sonucunda oluşan parçalar, elektroforez ile ayrılabilir. Bu yöntem özellikle epidemiyolojik çalışmalar için önemlidir<sup>39</sup>.

*g) Luciferase Reporter Assay:*

Bu yöntem, ilaç direncinin hızlı belirlenmesi için geliştirilmiştir. Ateş böceklerinin ışık üretme sistemi olarak tanınan lusiferaz, ATP varlığında lusiferin ile etkileşir ve ışık yanar. Bir mikobakteriyofaj içine lusiferaz geni yerleştirilir. Mikobakteriyofaj, mikobakteriye bağlanınca faj DNA'sı bakteriye enjekte olur. Basil içinde lusiferaz üretilir. Ortama antimikobakteriyel ajan konunca, basil ilaca duyarlı ise, ATP üretmez ve ışık oluşmaz<sup>3</sup>.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Mikrobiyolojik Çalışmalar

##### 3.1.1. Gereç ve Yöntem

##### 3.1.1.1. Mikroorganizmalar

Hastadan izole edilmiş, kültürde üretilmiş ve ARB'si yapılmış *M. tuberculosis* suşu ve Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Tüberküloz Referans Laboratuvarından temin edilen *M. tuberculosis* H37Rv referans suşu çalışmalarda kullanılmıştır.

##### 3.1.1.2. Besiyerleri

##### Löwenstein-Jensen besiyeri (Difco):

|                                                 |        |
|-------------------------------------------------|--------|
| (Monopotasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ )) | 0,6 g  |
| Magnesium sülfat ( $MgSO_4 \cdot 12 H_2O$ )     | 0,06 g |
| Magnesium sitrat                                | 0,15 g |
| Asparajin                                       | 0,9 g  |
| Patates unu                                     | 30g    |
| Malaşit Yeşili (%2)                             | 5 ml   |
| Distile su                                      | 150 ml |
| Yumurta                                         | 7 adet |
| Gliserin                                        | 3 ml   |

##### Modifiye Besiyeri- A

|                      |           |        |
|----------------------|-----------|--------|
| Kartofel-Glukoz-Agar | (Merck).. | 9,75 g |
| Pepton               | .....     | 1,25 g |
| Gliserin             | .....     | 3 ml   |
| Malaşit yeşili       | .....     | 7 ml   |
| Distile su           | .....     | 150ml  |
| Yumurta              | .....     | 7 adet |
| Malaşit Yeşili (%2)  |           | 5 ml   |

##### Modifiye Besiyeri – B

|                        |       |        |
|------------------------|-------|--------|
| Glukoz (Merck)         | ..... | 10 g   |
| Agar (Difco)           | ..... | 10 g   |
| Haşlanmış havuç ezmesi | ..... | 5 g    |
| Gliserin               | ..... | 3 ml   |
| Malaşit yeşili (%2)    | ..... | 7 ml   |
| Distile su             | ..... | 150 ml |
| Yumurta                | ..... | 7 adet |

### Modifiye Besiyeri – C

|                               |       |        |
|-------------------------------|-------|--------|
| Glukoz (Merck)                | ..... | 10 g   |
| Agar (Difco)                  | ..... | 10 g   |
| Haşlanmış bezelye ezmesi..... |       | 5 g    |
| Gliserin                      | ..... | 3 ml   |
| Malaşit yeşili (%2)           | ..... | 7 ml   |
| Distile su                    | ..... | 150 ml |
| Yumurta                       | ..... | 7 adet |

### Modifiye Besiyeri –D

|                     |       |        |
|---------------------|-------|--------|
| Agar (Difco)        | ..... | 10 g   |
| Glukoz (Merck)      | ..... | 10 g   |
| Çiğ elma püresi     | ..... | 5 g    |
| Gliserin            | ..... | 3 ml   |
| Malaşit yeşili (%2) | ..... | 7 ml   |
| Distile su          | ..... | 150 ml |
| Yumurta             | ..... | 7 adet |

### 3.1.1.3. Cam malzemeler

Test tüpleri  
Petri kutusu  
Balon Joje  
Cam boncuk (3 mm çaplı)  
Cam pipetler (Greiner) (1 ml, 5ml, 10ml)  
Cam huni

### 3.1.1. 4. Cihazlar

Otoklav (Nüve OT 4060)  
Pasteur fırını (Heraeus NR 900)  
Vorteks (Fırlabo. sa)  
Etüv (Nüve)  
Hassas terazi (Shimadzu)  
Mikroskop (Olympus)  
pH metre (Appoyal)  
Güvenlik kabini  
Su banyosu (Kotterman)  
Otomatik pipet (Greiner) (5ml)  
Magic Bullet (Ezici)

### 3.1.2 Yöntem

#### 3.1.2.1 Malaşit Yeşili Solüsyonu Hazırlanması

2 g malaşit yeşili steril bir havan içinde ezildi. 100 ml steril distile su içinde homojenize edilerek besiyerlerine uygun miktarda ilave edildi.

#### 3.1.2.2 Yumurtaların Hazırlanması

1) Yumurta kabukları fırça ile ve musluk suyu önünde temizlendi ve kurutma kağıdının üstünde kurutuldu.

2) Yumurta kabuklarının dezenfeksiyonu için, alkol emdirilmiş gazlı bezle yumurtaların dış yüzeyi ovuldu ve alkolün kuruması beklendi.

3) İçlerinde cam boncuklar olan büyük cam balonlara yumurtalar tek tek kırıldı.

4) Yumurtalar homojenize oluncaya kadar kuvvetlice ve hızla çalkalandı.

5) Yumurtalar, gazlı bez konmuş huniden, temiz bir balon içine süzüldü.

#### 3.1.2.3 Löwenstein–Jensen Besiyerinin Hazırlanması

1) Merck firmasına ait hazır besiyerinden 18,75 g tartılarak cam balona konuldu.

2) Steril distile su ilave edildi.

3) 3ml gliserol ilave edildi.

4) Karışımın homojen bir şekilde çözünbilmesi için 90° C su banyosunda 30 dakika bekletildi.

5) Uygun miktar %2'lik malaşit yeşili çözeltisi, pipetle balon kenarından ilave edildi.

6) Homojenize edilmiş yumurtalar, bu karışıma huni yardımı ile hava kabarcığı olmaması için yavaşça ilave edildi.

7) Besiyerinin pH'ı pH metre ile kontrol edildi.

8) Besiyerlerinin pH' sını 7,4–7,6 ya ayarlayabilmek için %10'luk NaOH veya %10'luk HCl kullanıldı.

9) Hazırlanan besiyeri steril tüplere eşit miktarda, hava kabarcığı oluşmayacak şekilde tüplerin yan duvarından aktarıldı. Bütün bu işlemler bek alevinde gerçekleştirildi.

10) Tüpler tablalara yatık olarak yerleştirildi.

11) Hava kabarcıklarının oluşması halinde, kabarcıklar kaybolana kadar tüpler hafifçe sallandı.

12) Önceden 80° C' ye ayarlanmış koagülatöre yerleştirildi ve 1 saat koagüle edildi.

#### 3.1.2.4 Modifiye Besiyeri –A' nın Hazırlanması

- 1) Maddeler hassas terazide tartılarak cam balona kondu.
- 2) Steril distile su ilave edildi.
- 3) 3ml gliserol ilave edildi.
- 4) Karışımın homojen bir şekilde çözünebilmesi için 90<sup>0</sup> C su banyosunda 30 dakika bekletildi.
- 5) Uygun miktar %2'lik malaşit yeşili çözeltisi pipetle balon kenarından ilave edildi.
- 6) Bu karışıma homojenize edilmiş yumurtalar huni yardımı ile hava kabarcığı olmaması için yavaşça ilave edildi.
- 7) Besiyerinin pH'ı pH metre ile kontrol edildi.
- 8) Besiyerlerinin pH'sını 7,4-7,6'ya ayarlayabilmek için %10 'luk NaOH veya %10'luk HCl kullanıldı.
- 9) Hazırlanan besiyeri steril tüplere eşit miktarda, hava kabarcığı oluşmayacak şekilde tüplerin yan duvarından aktarıldı. Bütün bu işlemler bek alevinde gerçekleştirildi.
- 10) Tüpler tablalara yatık olarak yerleştirildi.
- 11) Hava kabarcıklarının oluşması halinde, kabarcıklar kaybolana kadar tüpler hafifçe sallandı.
- 12) Önceden 80<sup>0</sup> C'ye ayarlanmış koagülatöre yerleştirildi ve 1 saat koagüle edildi.

#### 3.1.2.5 Modifiye Besiyeri –B' nin Hazırlanması

- 1) Maddeler hassas terazide tartılarak cam balona kondu.
- 2) Kabukları soyulmuş havuç, suyu bitene kadar haşlandı.
- 3) Magic Bullette ezildi ve uygun miktar tartılarak balona ilave edildi.
- 4) Steril distile su ilave edildi.
- 5) 3ml gliserol ilave edildi.
- 6) Karışımın homojen bir şekilde çözünebilmesi için 90<sup>0</sup> C su banyosunda 30 dakika bekletildi.
- 7) Uygun miktar %2'lik malaşit yeşili çözeltisi pipetle balon kenarından ilave edildi.
- 8) Bu karışıma homojenize edilmiş yumurtalar huni yardımı ile hava kabarcığı olmamsı için yavaşça ilave edildi.
- 9) Besiyerinin pH'ı pH metre ile kontrol edildi.
- 10) Besiyerlerinin pH'sını 7,4-7,6'ya ayarlayabilmek için %10'luk NaOH veya %10'luk HCl kullanıldı.
- 11) Hazırlanan besiyeri steril tüplere eşit miktarda, hava kabarcığı oluşmayacak şekilde tüplerin yan duvarından aktarıldı. Bütün bu işlemler bek alevinde gerçekleştirildi.

- 12) Tüpler tablalara yatık olarak yerleştirildi.
- 13) Hava kabarcıklarının oluşması halinde, kabarcıklar kaybolana kadar tüpler hafifçe sallandı.
- 14) Önceden 80° C'ye ayarlanmış koagülatöre yerleştirildi ve 1 saat koagüle edildi.

#### 3.1.2.6 Modifiye Besiyeri –C' nin Hazırlanması

- 1) Maddeler hassas terazide tartılarak cam balona kondu.
- 2) Bezelye taneleri yumuşayınca kadar kaynatıldı.
- 3) Haşlanmış bezelyelerin kabukları steril eldiven giyilerek soyuldu uygun miktarda cam balona ilave edildi. Steril distile su ilave edildi.
- 4) 3ml gliserol ilave edildi.
- 5) Karışımın homojen bir şekilde çözünebilmesi için 90° C su banyosunda 30 dakika bekletildi.
- 6) Uygun miktar %2'lik malaşit yeşili çözeltisi pipetle balon kenarından ilave edildi.
- 7) Bu karışıma homojenize edilmiş yumurtalar huni yardımı ile hava kabarcığı olmaması için yavaşça ilave edildi.
- 8) Besiyerinin pH'ı pH metre ile kontrol edildi.
- 9) Besiyerlerinin pH'sını 7,4-7,6' ya ayarlayabilmek için %10 'luk NaOH veya %10'luk HCl kullanıldı.
- 10) Hazırlanan besiyeri steril tüplere eşit miktarda, hava kabarcığı oluşmayacak şekilde tüplerin yan duvarından aktarıldı. Bütün bu işlemler bek alevinde gerçekleştirildi.
- 11) Tüpler tablalara yatık olarak yerleştirildi.
- 12) Hava kabarcıklarının oluşması halinde, kabarcıklar kaybolana kadar tüpler hafifçe sallandı.
- 13) Önceden 80° C'ye ayarlanmış koagülatöre yerleştirildi ve 1 saat koagüle edildi.

#### 3.1.2.7 Modifiye Besiyeri –D' nin Hazırlanması

- 1) Maddeler hassas terazide tartılarak cam balona kondu.
- 2) Elmanın kabuğu soyulduktan sonra Magic Bullette püre haline getirildi. Uygun miktarda tartılarak cam balona ilave edildi.
- 3) Steril distile su ilave edildi.
- 4) 3ml gliserol ilave edildi.
- 5) Karışımın homojen bir şekilde çözünebilmesi için 90° C su banyosunda 30 dakika bekletildi.
- 6) Uygun miktar %2'lik malaşit yeşili çözeltisi pipetle balon kenarından ilave edildi.
- 7) Bu karışıma homojenize edilmiş yumurtalar huni yardımı ile hava kabarcığı olmaması için yavaşça ilave edildi.

- 8) Besiyerinin pH'ı pH metre ile kontrol edildi.
- 9) Besiyerlerinin pH'sını 7,4-7,6'ya ayarlayabilmek için %10'luk NaOH veya %10'luk HCl kullanıldı.
- 10) Hazırlanan besiyeri steril tüplere eşit miktarda, hava kabarcığı oluşmayacak şekilde tüplerin yan duvarından aktarıldı. Bütün bu işlemler bek alevinde gerçekleştirildi.
- 11) Tüpler tablalara yatık olarak yerleştirildi.
- 12) Hava kabarcıklarının oluşması halinde, kabarcıklar kaybolana kadar tüpler hafifçe sallandı.
- 13) Önceden 80° C'ye ayarlanmış koagülatöre yerleştirildi ve 1 saat koagüle edildi.

Besiyerinde kullanılan elmalar pişirilerek de aynı modifikasyon denendi.

### 3.1.3 İnokulum Hazırlanması

Katı besiyerinde üremiş *M. tuberculosis* H37Rv kolonilerden 1'er öze dolusu alınarak, cam boncuklu, 5 ml distile su ile ayrı ayrı süspanse edildi. Süspansiyon vortekslenerek homojenize edildi. 20–30 dakika beklendi. Süpernatant steril bir cam tüpe alındı. Bulanıklığı McFarland 0,5 yoğunluğuna gelinceye kadar süpernatant steril distile su ile ilave edilerek stok kültürler hazırlandı.

İnokülasyon hazırlık ve besiyerlerine İnokülasyon işlemleri biyolojik güvenlik kabini içinde yapıldı.

### 3.1.4 Besiyerlerine İnokülasyon

Löwenstein-Jensen ve 4 Modifiye besiyerinden 21'er adet mikropipet yardımıyla, klinik *M. tuberculosis* izolat ve *M. tuberculosis* H37 Rv suşlarından 0,2 ml inoküle edildi. Tüp ve petrilerin ağızları parafin bant ile kapatıldı.

Besiyerine inokulumların absorpsiyonu için tüpler, ekim yapılan yüzeyleri yukarıya bakacak şekilde tepsilere yerleştirildi, 37°C'lik inkübatöre konuldu. Besiyerlerindeki kurumayı önlemek için inkübatörün içine düzenli olarak içinde su bulunan ağız açık petriler konuldu, besiyeri bulunan tüp ve petrilerde parafin bandı ile kapakları bantlandı. İlk birkaç gün içinde tüpler kontrol edilerek, diğer bakterilerle kontaminasyon olasılığı için kontrol edildi. Besiyerlerinin sterilite kontrolü amacıyla *M. tuberculosis* H37Rv ve *M. tuberculosis* izolat suşu ekilmemiş besiyerleri de test edildi.

1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ve 24'ncü günlerde üreme kontrolü yapıldı. Üremeler zaman ve yoğunluk açısından değerlendirildi.

Oluşan kolonilerden preparat hazırlandı ve *Ziehl-Neelsen* yöntemiyle boyanarak ARB varlığı doğrulandı.

### 3.2 İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi için SPSS (Statistical Package for Social Science) 11,5 paket programı kullanıldı. Üreme şiddetine ilişkin tanımlayıcı istatistikler ortanca (minimum - maksimum) olarak gösterildi. Besiyerleri ve günler arasında üreme yoğunluk yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı Kruskal Wallis testiyle incelendi. Kruskal Wallis test istatistiğinin anlamlı bulunduğu durumlarda ise Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi kullanılarak anlamlı farka neden olan besiyerleri ve günler belirlendi. Olası tüm alt grup karşılaştırmalarında Bonferroni Düzeltmesi yapıldı. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ( $p<0,05$ ).

### 3.3 Besiyerlerinin Maliyet Hesapları

#### 3.3.1 Löwenstein-Jensen'in Maliyet Hesabı<sup>51,52</sup>

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| Löwenstein-Jensen (Merck)                                    | 3,986 YTL |
| <i>(Monopotassium phosphate (<math>KH_2PO_4</math>))</i>     |           |
| <i>Magnesium sulfate (<math>MgSO_4 \cdot 12 H_2O</math>)</i> |           |
| <i>Magnesium Citrate</i>                                     |           |
| <i>Patates unu</i>                                           |           |
| <i>Asparagine</i>                                            |           |
| <i>Malaşit Yeşili (%2)</i>                                   |           |

|          |           |
|----------|-----------|
| Yumurta  | 1,050 YTL |
| Gliserin | 0,245 YTL |

TOPLAM MALİYETİ: 5,281 YTL/250ml

#### 3.3.2. Modifiye Besiyeri- A'nın Maliyet Hesabı<sup>51,52</sup>

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| Kartofel-Glukoz-Agar (Merck) | 1,675 YTL |
| Pepton                       | 0,159 YTL |
| Gliserin                     | 0,245 YTL |
| Malaşit yeşili               | 0,381 YTL |
| Yumurta                      | 1,050 YTL |

TOPLAM MALİYETİ: 3,51 YTL/250ml

### 3.3.3 Modifiye Besiyeri – B'nin Maliyet Hesabı<sup>51,52,53</sup>

|                         |                       |
|-------------------------|-----------------------|
| Glukoz (Merck)          | 0,922 YTL             |
| Agar (Difco)            | 1,969 YTL             |
| Haşlanmış havuç ezmesi  | 0,002 YTL             |
| Gliserin                | 0,245 YTL             |
| Malaşit yeşili          | 0,381 YTL             |
| Yumurta                 | 1,05 YTL              |
| <b>TOPLAM MALİYETİ:</b> | <b>4,569YTL/250ml</b> |

### 3.3.4 Modifiye Besiyeri – C'nin maliyet hesabı<sup>51,52,53</sup>

|                          |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| Glukoz (Merck)           | 0,922 YTL               |
| Agar (Difco)             | 1,969 YTL               |
| Haşlanmış bezelye ezmesi | 0,0065 YTL              |
| Gliserin                 | 0,245 YTL               |
| Malaşit yeşili           | 0,381 YTL               |
| Yumurta                  | 1.050 YTL               |
| <b>TOPLAM MALİYETİ:</b>  | <b>4.5735 YTL/250ml</b> |

### 3.3.5 Modifiye Besiyeri –D'nin maliyet hesabı<sup>51,52,53</sup>

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| Agar (Difco)    | 1,969 YTL |
| Glukoz (Merck)  | 0,922 YTL |
| Çiğ elma püresi | 0,006 YTL |
| Gliserin        | 0,245 YTL |
| Malaşit yeşili  | 0,381 YTL |
| Yumurta         | 1,050 YTL |

**TOPLAM MALİYETİ: 4,573 YTL/250ml**

**Tablo 6. Besiyerlerinin toplam maliyetleri**<sup>52-54,</sup>

| <b>Besiyeri 250 ml</b> | <b>Toplam maliyeti</b> |
|------------------------|------------------------|
| Löwenstein -Jensen     | 5.281 YTL              |
| Modifiye -A            | 3.51 YTL               |
| Modifiye –B            | 4.569 YTL              |
| Modifiye –C            | 4.5735 YTL             |
| Modifiye -D            | 4.573 YTL              |

**Tablo 7. Besiyerinde kullanılan maddelerin ekonomik değerleri**<sup>52-54</sup>

|                     | Birim miktarlar | Kullanılanın YTL değeri | 1000g fiyatı |
|---------------------|-----------------|-------------------------|--------------|
| Löwenstein-Jensen   | 18,75 g         | 3,986 YTL               | 212,57 YTL   |
| Pepton              | 1,25 g          | 0,159 YTL               | 127,13 YTL   |
| Agar                | 10 g            | 1,969 YTL               | 196,88 YTL   |
| Patote-dekstrozağar | 9,75 g          | 1,675 YTL               | 171,79 YTL   |
| Malaşit yeşili      | 0,7 g           | 0,381 YTL               | 544,17 YTL   |
| Gliserin            | 3 ml            | 0,245 YTL               | 1,63 YTL     |
| Yumurta adet        | 1 adet          | 0,15 YTL                | 0,15 YTL     |
| Elma                | 5 g             | 0,006 YTL               | 1,20 YTL     |
| Bezelye             | 5 g             | 0,0065 YTL              | 1,30 YTL     |
| Havuç               | 5 g             | 0,002 YTL               | 0,40 YTL     |
| Glukoz              | 10 g            | 0,922 YTL               | 92,182 YTL   |

#### 4. BULGULAR

Löwenstein-Jensen besiyeri ve formülasyonları ilk defa denenilen 4 modifiye besiyerine (Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Havuçlu Modifiye Besiyeri-B, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D) *M.tuberculosis* izolatu ve referans suş olarak *M. tuberculosis* ATCC 27294 H37Rv inoküle edilerek 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24. günlerde üreme kontrolleri yapıldı. 1, 2, 3. günlerdeki ekimler mikobakteri dışı bakterilerle kontaminasyonu kontrol etmek amacı ile yapıldı ve kontaminasyon olan örnekler ayrıldı. 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ve 24. günlerde yapılan kontrolde üreme yoğunluğu ve dereceleri besiyerleri izlem tablolarına kaydedildi.

Elmalı besiyerinin hazırlanmasında hem çiğ hem de pişmiş elma kullanılmış fakat Mikobakteri üremelerinde anlamlı bir fark görülmemiştir.

*M. tuberculosis*'in besiyerlerindeki üreme dereceleri Dünya Sağlık Örgütü'nün koloni sayılarına göre hesaplanan derecelendirme tablosu kullanılarak değerlendirildi<sup>17</sup>.

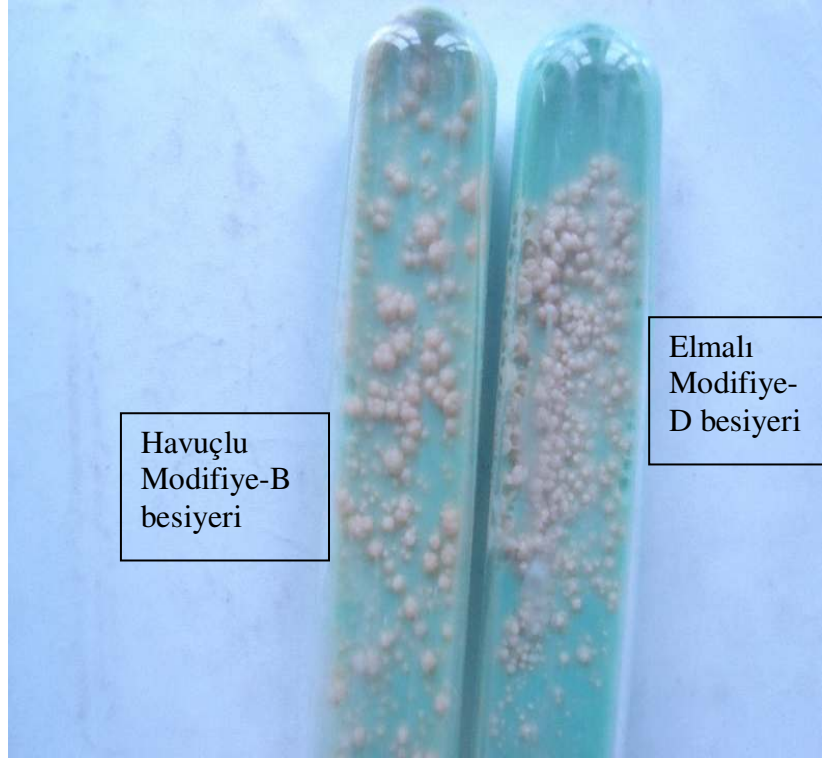
*Mycobacterium*'ün üremeye başlama zamanı ve yoğunluğu değerlendirildi. Buna göre 9. günde bütün besiyerlerinde üreme görüldü. Burada oluşan koloni sayıları, Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği uluslararası derecelendirme tablosuna göre değerlendirildi. Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D'de üreme yoğunluğu birbirine yakın olmakla beraber üreme yoğunluklarının Löwenstein-Jensen besiyeri ve Havuçlu Modifiye Besiyeri-B besiyerlerine göre daha fazla olduğu tespit edildi. Löwenstein-Jensen besiyeri ve Havuçlu Modifiye Besiyeri-B'nin üreme yoğunluğu birbirine yakın görüldü ancak anlamlı bir fark bulunamadı. Üreme yoğunluklarına baktığımız zaman en iyi üremenin, Patatesli Modifiye Besiyeri-A ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D'de olduğu görülmekle birlikte aralarında anlamlı bir fark tespit edilemedi. Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D'nin de Patatesli Modifiye Besiyeri-A ile aralarında anlamlı bir fark bulunamadı.

Yine 12. günde de Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ile Elmalı Modifiye Besiyeri-D besiyeri üreme yoğunlukları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Modifiye Besiyeri-C ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D en fazla üreme yoğunluğuna sahiptir. Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C'nin yoğunluğu Löwenstein-Jensen' den daha fazla bulunmakla birlikte aradaki fark anlamlı değildir. Patatesli Modifiye Besiyeri-A ve Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C arasında anlamlı bir fark olmamakla beraber en az yoğunluk bu iki besiyeri arasında görülmüştür. 9'cu gün ile 12. günler arasında Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Havuçlu Modifiye Besiyeri-B, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D'de ve Löwenstein –Jensen besiyerlerinde anlamlı bir fark bulunmuş fakat Patatesli Modifiye Besiyeri-A' da 9.'cu gün ve 12. günler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

15. günde Löwenstein-Jensen Besiyeri, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D besiyerlerinin üreme yoğunlukları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Patatesli Modifiye Besiyeri-A'da üreme yoğunluğu fazla olduğu için Löwenstein-Jensen besiyerine göre anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Burada anlamlı bir fark da elmalı Modifiye Besiyeri-D ile Havuçlu Modifiye Besiyeri-C arasında görülmüştür ( $p<0,05$ ).

18. günde Löwenstein-Jensen ile elmalı Modifiye Besiyeri-D'nin üreme yoğunluğu diğer bütün besiyerlerinden yoğun bulunmuş ve aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Patatesli Modifiye Besiyeri-A, havuçlu Modifiye Besiyeri-B ve bezelyeli Modifiye Besiyeri-C arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

21. günde Löwenstein-Jensen besiyerinden daha sonra Patatesli Modifiye Besiyeri-A'da üreme yoğunluğu en fazladır. Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ile Havuçlu Modifiye Besiyeri-B arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.



Şekil 6. Havuçlu ve elmalı modifiye besiyerlerinde koloni morfolojileri



Şekil 7. Patatesli Modifiye-A Besiyeri ve Havuçlu Modifiye Besiyeri-B'nin Görünümleri

**Tablo 8.** Besiyerleri İçerisinde Günlere Göre Suşlar Arasında Üreme Şiddet Skorlarının Dağılımı

|               | Kontrol       |              |                    | Grup A        |              |          | Grup B        |              |                    | Grup C        |              |                    | Grup D        |              |                    |
|---------------|---------------|--------------|--------------------|---------------|--------------|----------|---------------|--------------|--------------------|---------------|--------------|--------------------|---------------|--------------|--------------------|
|               | <i>İzolat</i> | <i>H37RV</i> | <i>p</i>           | <i>İzolat</i> | <i>H37RV</i> | <i>p</i> | <i>İzolat</i> | <i>H37RV</i> | <i>p</i>           | <i>İzolat</i> | <i>H37RV</i> | <i>p</i>           | <i>İzolat</i> | <i>H37RV</i> | <i>p</i>           |
| <b>9.Gün</b>  | 0 (0-1)       | 0 (0-1)      | 0.003 <sup>a</sup> | 1 (0-2)       | 1 (0-2)      | 0.668    | 1 (0-1)       | 0 (0-1)      | 0.003 <sup>a</sup> | 1 (0-2)       | 0 (0-2)      | 0.085              | 1 (1-2)       | 1 (0-2)      | 0.035 <sup>a</sup> |
| <b>12.Gün</b> | 2 (0-3)       | 2 (0-3)      | 0.958              | 1 (0-3)       | 1 (0-3)      | 0.936    | 1 (0-3)       | 1 (0-3)      | 0.030 <sup>a</sup> | 2 (1-3)       | 2 (0-3)      | 0.007 <sup>a</sup> | 2 (1-3)       | 2 (0-3)      | 0.968              |
| <b>15.Gün</b> | 2 (1-3)       | 2 (1-3)      | 0.682              | 1 (0-3)       | 2 (0-3)      | 0.645    | 3 (0-3)       | 1 (0-3)      | 0.015 <sup>a</sup> | 2 (1-3)       | 1 (0-3)      | 0.006 <sup>a</sup> | 3 (1-3)       | 2 (0-3)      | 0.052              |
| <b>18.Gün</b> | 3 (2-3)       | 3 (2-3)      | 0.682              | 2 (1-3)       | 2 (1-3)      | 0.957    | 2 (0-3)       | 1 (0-3)      | 0.135              | 2 (1-3)       | 1 (0-3)      | 0.004 <sup>a</sup> | 3 (2-3)       | 2 (0-3)      | <0.001             |
| <b>21.Gün</b> | 3 (2-3)       | 3 (2-3)      | 0.682              | 2 (1-3)       | 2 (1-3)      | 0.957    | 2 (0-3)       | 1 (0-3)      | 0.081              | 2 (1-3)       | 1 (0-3)      | 0.010 <sup>a</sup> | 3 (2-3)       | 2 (0-3)      | <0.001             |

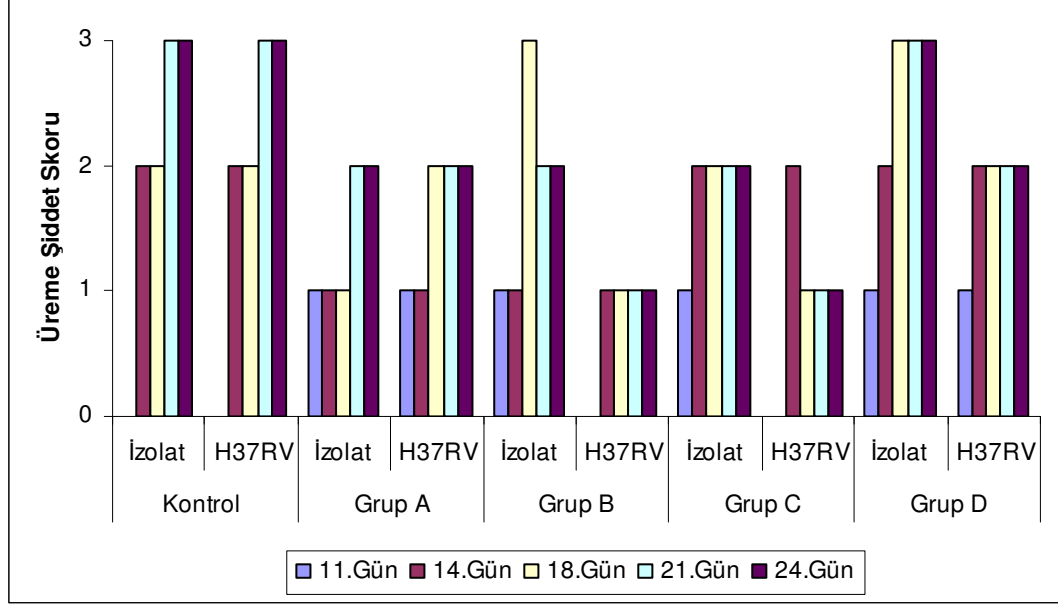
a Bonferroni Düzeltmesine göre bölgeler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değil ( $p>0.002$ ).

**Tablo 9.** Zamana Bağlı Olarak Besiyerleri Arasında Üreme Şiddet Skorlarının Dağılımı

|               | Kontrol | Grup A  | Grup B  | Grup C  | Grup D  | <i>p<sup>a</sup></i> | <i>Çoklu Karşılaştırma Sonuçları (<math>p&lt;0.001</math> ise gruplar arasındaki fark anlamlı )</i> |        |       |        |       |        |        |       |        |       |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|
|               |         |         |         |         |         |                      | K-A                                                                                                 | K-B    | K-C   | K-D    | A-B   | A-C    | A-D    | B-C   | B-D    | C-D   |
| <b>9.Gün</b>  | 0 (0-1) | 1 (0-2) | 1 (0-1) | 1 (0-2) | 1 (1-2) | <0.001               | 0,357                                                                                               | 0,792  | 0,005 | <0,001 | 0,511 | 0,058  | 0,011  | 0,011 | 0,002  | 0,509 |
| <b>12.Gün</b> | 2 (0-3) | 1 (0-3) | 1 (0-3) | 2 (1-3) | 2 (1-3) | <0.001               | 0,099                                                                                               | 0,874  | 0,014 | 0,057  | 0,136 | <0,001 | <0,001 | 0,009 | 0,040  | 0,571 |
| <b>15.Gün</b> | 2 (1-3) | 1 (0-3) | 3 (0-3) | 2 (1-3) | 3 (1-3) | 0.003                | 0,008                                                                                               | 0,421  | 0,885 | 0,215  | 0,059 | 0,012  | <0,001 | 0,509 | 0,042  | 0,167 |
| <b>18.Gün</b> | 3 (2-3) | 2 (1-3) | 2 (0-3) | 2 (1-3) | 3 (2-3) | <0.001               | 0,019                                                                                               | <0,001 | 0,021 | 0,459  | 0,215 | 0,962  | 0,002  | 0,198 | <0,001 | 0,003 |
| <b>21.Gün</b> | 3 (2-3) | 2 (1-3) | 2 (0-3) | 2 (1-3) | 3 (2-3) | <0.001               | 0,018                                                                                               | <0,001 | 0,020 | 0,454  | 0,258 | 0,967  | 0,002  | 0,241 | <0,001 | 0,002 |

a Kruskal Wallis varyans testi

**Tablo 10.** Besiyerleri ve suşlar arasında üreme skorları grafiği



Besiyerleri içinde suşların üreme yoğunluklarına baktığımız zaman 9. ve 12. günler arasındaki üreme yoğunlukları Tablo 11’de gösterildiği gibi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu gözlenmiştir. Löwenstein-Jensen’de ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D besiyerinde anlamlı olarak artış olmuştur. Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ve Havuçlu Modifiye Besiyeri-B besiyerlerindeki artışın da anlamlı olduğu görülmüştür.

Yapılan Patatesli Modifiye Besiyeri -A, Havuçlu Modifiye-B, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C, Elmalı Modifiye Besiyeri -D ve Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen kolonilerden yapılan Ziehl-Neelsen ile boyama yöntemi ile *M. tuberculosis* varlığı doğrulandı. Tüm besiyerinden yapılan subkültür sonucu pasajlarında üreme tekrar görülmüştür.

Bizim çalışmamızda kullandığımız meyve ve sebzeler; patates, havuç, elma ve bezelye dünyanın her yerinde ve her mevsim bulunan özel yetiştirme şartları gerektirmeyen besin maddeleridir ve maliyetleri çok düşüktür, Hazırladığımız Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Havuçlu Modifiye Besiyeri-B, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D besiyerlerinin fiyatları Löwenstein-Jensen’den daha düşüktür.

Hazırladığımız besiyerlerine baktığımız zaman Löwenstein-Jensen istatistiksel olarak anlamlı en pahalı besiyeri iken, üremenin en

erken başladığı ve en hızlı olan Patatesli Modifiye Besiyeri-A besiyerinin en ucuz besiyeri olduğu görülmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Tüberküloz binlerce yıl öncesinden günümüze kadar ulaşmış ülkemizdeki ve dünyadaki insanların, onların ailelerinin ve yaşadıkları toplumların hayatlarını tıbbi, sosyo-ekonomik ve kültürel açılarından etkilemiştir.

Tüberkülozun en önemli bulaşma yolu, akciğer tüberkülozu olan hastaların balgam ile çıkardığı bakterilerin, sağlıklı kişiler tarafından solunum yolu ile alınmasıdır. Bu nedenle toplumu tüberkülozdan korunmanın en önemli yolu tüberküloz hastalarının erken tanısı ve tedavisinden geçer<sup>3</sup>.

Tüberküloz hastalığında son yıllardaki en büyük değişiklik bakteriyolojik tanı açısından olmuştur. Öncelikle, direkt mikroskopi ile basilin gösterilmesi, klinik bulgular ile uyum halinde tanıya yeterli görülmekte iken, 1950'li yıllardan itibaren kültür yöntemleri de önem kazanmaya başlamış, zamanla mikobakteriyoloji laboratuvarlarının, hastalığın tanı ve tedavisinin yönlendirilmesinde önemli sorumlulukları olduğu anlaşılmıştır. Tüberküloz sürveyansı salgın kontrolü, hastaların tedavi uyumunun takibi ve eğitim gibi konular yanında, laboratuvar çalışmaları ve yapılması gerekenlere çok önemli bir bölümü oluşturmakta, direkt tanı yanında, mutlaka kültür ilaç duyarlılıklarının çalışılması, ayrıca "*M. tuberculosis* kompleksi" tanımının en erken şekilde yapılmasının gerekli olduğu vurgulanmaktadır<sup>1</sup>.

Kültür yapılmaksızın klinik örneğin yalnızca mikroskopta incelenmesi, enfeksiyona karar vermek açısından yeterli değildir. Bu nedenle, etkenin tanımlanması, antitüberküloz duyarlılık deneylerinin uygulanması ve epidemiyolojik açıdan incelenmesi için, klinik örneklerin mikobakterilerin üreyebileceği özel ortamlara ekilmesi gerekmektedir. Kullanılan kültür ortamlardan biri Löwenstein-Jensen olmalıdır. Kültür yöntemleri, uzun yıllardır tüberküloz tanısında en güvenilir yöntem olarak varlığını korumaktadır<sup>51</sup>.

Son yıllarda biyokimyadaki gelişmeler birçok yeni ve hızlı moleküler araştırma ve tanı yöntemlerinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu araştırmaların klinik mikrobiyolojide en önemli yansımalarından biri ise, moleküler tanı yöntemlerini, kültürde zor üretilen veya hiç üretilmeyen, mikroskopik inceleme ile zor saptanan veya hiç saptanamayan enfeksiyon etkenlerinin tanısında kullanılmalarıdır. Hızlı kültür sistemleri geliştirilmesi ile bu süre ancak yarıya indirilebilmiştir<sup>3,4</sup>. Bunlar içerisinde özellikle PCR,

kullanım kolaylığı ve çeşitli tanı sistemlerine kolayca uygulanabilir olması nedeniyle yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu incelemelerin yapılabilmesi, zahmetli, uzun süre gerektiren, pahalı jel elektroforez sistemleri ile gerçekleştirilebildiğinden, çok sayıda örneğin işlenip araştırıldığı laboratuarlarda kullanıma girememiştir. Moleküler teknikler ile birkaç gün içerisinde belirlenmesi, olanaklı hale gelmiştir. Ancak bu moleküler yöntemler, uygulamadaki zorlukları nedeniyle, günlük kullanıma yaygın olarak girememiştir<sup>5</sup>.

Çalışmamızda *M. tuberculosis*'in, hazırlanması kolay olan, özel laboratuvar şartları ve malzemeleri gerektirmeyen, herkes tarafından hazırlanabilecek, malzemelerinin temini kolay ve ucuz olan kültür ortamları hazırlamak amaçlanmıştır. Geliştirdiğimiz besiyerlerinin uygunluğunun belirlenmesi için Löwenstein-Jensen besiyeri paralel olarak değerlendirmeye alınmıştır.

Hazırladığımız Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Havuçlu Modifiye Besiyeri-B, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C, Elmalı Modifiye Besiyeri-D besiyerlerinde, az sayıda *M. tuberculosis*'in dahi bol miktarda üremesinin sağlanmasına yönelik olarak çalışılmıştır. Hazırladığımız Patatesli Modifiye-A, Havuçlu Modifiye-B, Bezelyeli Modifiye-C, Elmalı Modifiye-D olmak üzere dört modifiye besiyerinde ve paralel olarak çalıştığımız Löwenstein- Jensen besiyerinde *M. tuberculosis* üremesi sağlanmıştır.

Yapılan Patatesli Modifiye-A, Havuçlu Modifiye-B, Bezelyeli Modifiye-C, Elmalı Modifiye-D besiyerlerinde ve Löwenstein-Jensen'de üreyen kolonilerden yapılan Ziehl-Neelsen ile boyama yöntemi *M. tuberculosis* varlığı doğrulanmıştır.

Rızman ve arkadaşları<sup>54</sup>; mikobakterilerin enerji gereksinimlerini basit karbon kaynaklarından sağladığını ve en kolay kullanabildiği karbon kaynağının gliserol, früktoz ve glikoz olduğunu bildirmişler ve lipitlerin  $\beta$ -oksidasyonu için kullandıkları asetil-CoA'ların karbon kaynağı basit karbonhidratlardan geldiğini belirtmişlerdir<sup>54</sup>. Çalışmamızda kullanılan Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Havuçlu Modifiye Besiyeri-B, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C, Elmalı Modifiye Besiyeri-D besiyerlerinin üreme yoğunluklarına ve sürelerine baktığımız zaman üremenin en fazla olduğu sırasıyla Patatesli Modifiye-A besiyerinde patatesin 100 gramında 21,2 g karbonhidrat, Elmalı Modifiye-D besiyerinde elmanın 100 gramında 14,5 g karbonhidrat ve Bezelyeli Modifiye-C besiyerinde bezelyenin 100 gramında 14,4 g karbonhidrat vardır. Besiyerlerindeki karbonhidrat miktarının üremede anlamlı bir fark oluşturduğu tespit edilmiştir. Besiyerlerindeki karbonhidrat yoğunluğu ile besiyerlerinin üreme yoğunluğu ve süresi arasında doğru orantı olduğu

saptanmıştır. Üreme yoğunluğu az olan ve üreme süresi daha uzun olan Havuçlu Modifiye Besiyeri-B'de karbonhidrat miktarı en düşüktür. Havucun 100 g'da 9,7 g karbonhidrat vardır. Havuçlu Modifiye Besiyeri-B ile Löwenstein-Jensen' in üreme yoğunluğu ve süresi açısından aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir<sup>55</sup>.

Maccabe ve Gould<sup>56</sup>; saponinli, insan kanlı ve agarlı (SBA) modifiye kültür besiyerinde *M. tuberculosis* izolasyonu yapmışlardır. *M. tuberculosis*' in izolasyonunda, kanlı saponinli agarı ve paralel olarak da Löwenstein-Jensen besiyerini kullanmışlar. SBA besiyerinin *M. tuberculosis*' in izolasyonunda Löwenstein-Jensen'den daha başarılı olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışmayı G.A. Dunlop ve B.D. Lowe<sup>52</sup> aynı besiyerini modifiye ederek yapmış ve beyaz saponinli kanlı agarlı ve kahverengi saponinli kanlı agarlı besiyerlerini ve Löwenstein-Jensen besiyelerini kullanmışlardır. *M. tuberculosis*' in Löwenstein-Jensen'deki üremesini daha anlamlı bulmuşlardır. Biz de çalışmamızda 4 Modifiye Besiyeri ve paralel olarak Löwenstein-Jensen kullandık.

Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D' de Löwenstein-Jensen'e göre *M. tuberculosis*' in çoğalması istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulduk. Havuçlu Modifiye Besiyeri-B ile Löwenstein-Jensen arasında genel olarak anlamlı bir fark yoktur.

V. Bassaca – Sevilla<sup>58</sup>; Hindistan Cevizi Suyu ve Malaşit Yeşilli Besiyerini (CEM) *M. tuberculosis*' in çoğalması için kullanmışlardır. CEM ismini verdikleri besiyerini Löwenstein-Jensen ile paralel olarak kullanmışlardır. CEM besiyerinde *M. tuberculosis*' in tipik olarak üremiş kolonilerini görmüşlerdir. *M. tuberculosis*' in CEM besiyerinde Löwenstein-Jensen'e göre daha iyi ürediğini belirtmişlerdir. Maliyet hesaplamasında da daha ucuz olduğunu bildirmişlerdir<sup>58</sup>. Hindistan cevizi ülkemizde ve dünyanın birçok yerinde pahalı bir üründür ve kurutulmamış meyve olarak ulaşılması çok zordur. Sri Lanka ve Hindistan Avrupa'nın Hindistan cevizi ihtiyacını karşılamaktadır. Taşıma yollarının uzunluğu Hindistan cevizi fiyatlarını arttırmaktadır. Bizim çalışmamızda kullandığımız meyve ve sebzeler; patates, havuç, elma ve bezelye dünyanın her yerinde ve her mevsim bulunan özel yetiştirme şartları gerektirmeyen besin maddeleridir ve maliyetleri çok düşüktür, Hazırladığımız Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Havuçlu Modifiye Besiyeri-B, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ve Elmalı Modifiye Besiyeri-D besiyerlerinin fiyatları Löwenstein-Jensen'den daha düşüktür.

Hazırladığımız besiyerlerine baktığımız zaman Löwenstein-Jensen istatistiksel olarak anlamlı en pahalı besiyeri iken, üremenin en

erken başladığı ve en hızlı olan Patatesli Modifiye Besiyeri-A besiyerinin en ucuz besiyeri olduğu görülmektedir.

Basaca-Sevilla<sup>58</sup>; CEM besiyerinin *M. tuberculosis*'in çoğaltılabilmesi için kullanılmasının uygun olduğunu, ayrıca hazırlamasının kolay olduğunu ve teknik beceri gerektirmediğini belirtmişlerdir. Maurice ve ark.<sup>59</sup> Kanlı agar besiyerinin hazırlanmasının kolay olduğunu belirtmişlerdir. Hazırladığımız Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Havuçlu Modifiye Besiyeri-B, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C, Elmalı Modifiye Besiyeri-D besiyerlerinin hazırlanması için de özel laboratuvar ortamları, çok özel kimyasallar ve teknik beceri gerekmemekte ve imkânların çok kısıtlı olduğu laboratuvar ortamlarında dahi hazırlanması kolay olan modifiye besiyerleridir.

Basaca – Sevilla<sup>58</sup>; CEM besiyeri ile yapmış olduğu çalışmada *M.tuberculosis* H37Rv'nin koloni morfolojisinin değişmemiş olduğunu, Dunlop<sup>57</sup>; beyaz saponinli kanlı agar ve kahverengi saponinli kanlı agarla yapmış olduğu çalışmada zeminin koyuluğuna bağlı olarak çok küçük olan kolonilerin çok iyi seçilemediğini belirtmişlerdir. Maurice ve ark.<sup>59</sup>. Kanlı agar besiyerinde *M. tuberculosis* kolonilerin 2. haftada tipik şeklini aldığını ancak daha öncesinde ışık altında iyi seçilebildiğini ve daha geç dönemde de kolonilerin renginin koyulaştığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda; Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Havuçlu Modifiye Besiyeri-B, Bezelyeli Modifiye Bersiyeri-C, Elmalı Modifiye Besiyeri-D besiyerlerin de koloni morfolojisi değişmemiş ve krem renginde, kuru ve R tipi koloniler tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan dört modifiye besiyerleri de *M. tuberculosis*'in izolasyonu için ideal besiyerleridir. Özellikle Patatesli Modifiye Besiyeri-A, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C ve Elmalı Modifiye Besiyeri-C'de 9.cu günde görülen üreme yoğunluğu Löwenstein-Jensen'den ve Havuçlu Modifiye Besiyeri-B'den daha fazla gözlemlendiği için *Mycobacterium* yoğunluğunun daha düşük olduğu materyalde inokulum için hızlı büyüme başlangıcını desteklediğini söyleyebiliriz.

*Mycobacterium*'un hızlı ve bol miktarda üremesini sağlamasına, pigment oluşumu ve koloni morfolojisine dayanarak izolatların identifikasyonunda ön fikir oluşturabilen 4 tane modifiye besiyeri elde etmiş olduk.

Çalışmamızdaki amaç; ucuz, hazırlanması için özel malzemeler, kimyasallar, fiziksel ortamlar gerektirmeyen ve kişisel yeteneğe dayamayan basit modifiye besiyerleri hazırlayabilmek ve bu hazırlanan değişik kombinasyondaki besiyerlerinde *M. tuberculosis* çoğalmasını sağlamaktır. Hazırladığımız Patatesli Modifiye Besiyeri-A,

Havuçlu Modifiye Besiyeri-B, Bezelyeli Modifiye Besiyeri-C, Elmalı Modifiye Besiyeri-D'de *M. tuberculosis* oalmasını ve oluşan tipik koloniler saptadık.

## 6. SONUÇ

Besiyerlerinin formülasyonu araştırmalarında temin edilebilen maddeler ve düşük maliyet ön plana alınarak besiyeri modifikasyonları denenmiştir. Çalışma klasik kültür yönteminde yaygın olarak kullanılan Löwenstein-Jensen ve dört farklı besiyeri, *Mycobacterium tuberculosis*'ın çabuk ve yoğun reyebilmesine dayanarak, erken tanı koyabilmek ve en ekonomik olanı saptamak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmamızın sonunda kullanılmakta olan besiyerlerine alternatif oluşturabilecek bu yeni modifiye besiyerlerinin dikkat çekecek özellikleri gözlemlendi. Modifiye besiyerlerinin dikkat çeken özellikleri ise; kısa sürede ve seçilebilir kolonilerin oluşması aynı zamanda dk maliyetli olmalarıdır. Modifiye besiyerleri ile ilgili birçok çalışmanın yapılabileceğini de ortaya çıkmıştır.

## 7. ÖZET

### **Mycobacterium tuberculosis BESİYERLERİNİN**

### **MODİFİKASYON ÇALIŞMASI**

Tüberküloz, Mycobacterium tuberculosis'in neden olduğu, en çok morbidite ve mortaliteye yol açan bir hastalıktır. Dünyada yaklaşık iki milyar kişi enfektedir. Yılda dokuz milyon kişinin hastalığa yakalandığı ve iki milyon kişinin öldüğü bilinmektedir.

M. tuberculosis yavaş üreyen bir bakteri olduğundan, tanıda kullanılan klasik kültür yöntemlerine dayanan izolasyon çalışmaları 1-2 ay sürebilmektedir. Bu çalışmada; besiyerlerinin formülasyonu araştırmalarında kolay temin edilebilen maddeler ve düşük maliyet ön plana alınarak besiyeri modifikasyonları denenmiştir.

Çalışmamızda elmalı, bezelyeli, havuçlu ve patatesli, dört Modifiye besiyeri oluşturuldu. Bu besiyerlerine ve Lowenstein Jensen besiyerine M. tuberculosis H37Rv ve bir izolat suş ekimleri yapıldı. Üçer günde bir üreme incelendi. Bu besiyerlerinin hepsinde Mycobacterium'un başarılı izolasyonu yapıldı. Tüm besiyerlerinde 9 günde üreme oldu, patatesli besiyerinde üreme daha yoğundu.

Kullanılmakta olan besiyerlerine alternatif oluşturabilecek bu yeni Modifiye besiyerlerinin dikkat çekecek özellikleri kısa sürede ve seçilebilir kolonilerin oluşması aynı zamanda da düşük maliyetli olmalarıdır.

Anahtar Kelimeler: Mycobacterium tuberculosis, Löwenstein-Jensen, Modifiye Besiyerleri,

## **8.SUMMARY**

### **Modification Studies of Mediums used for the growth of Mycobacterium tuberculosis.**

Tuberculosis is a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* that causes high morbidity and mortality. Approximately 2 billion people in the world is infected. Yearly, 9 million people get the disease and 2 million people die from this disease.

Because *M. tuberculosis* is a slow growing bacteria, isolation of the bacteria by the diagnostic methods that use classical mediums needs 1-2 months. In this study, modifications of medium were tested using supplies easily provided with low cost.

Four modified medium were prepared with apple, pea, carrot and potatoes. *M. tuberculosis* H37Rv and one isolate were inoculated in these four mediums and Löwenstein Jensen medium. Growth was observed in every three days. *M. tuberculosis* were successfully isolated from all these mediums. Growth was detected in 9 days in all the mediums; in potatoe medium growth was more pronounced.

These new modified mediums with the characteristics of low cost and early colony forming could be alternatives for the mediums currently used.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Löwenstein-Jensen, Modification Medium

## 9. KAYNAKLAR

1. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO report 2008. Geneva. World Health Organization (WHO/HTM/TB/2008.393). (Türkçe özet, [www.verem.org.tr](http://www.verem.org.tr)).
2. Kochi A. The Global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle*.1991, 72,1-6
3. Saniç A, Çoban AY. "Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı" Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D. 1999, s: 1-88.
4. Heifets LB, Dood RC, Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis "Tuberculosis" (Ed. Bloom BR)' de, Amerikan Society for Microbiology, Washington DC, 1994,s.85-110.
5. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Bodmer T. Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* . *Lancet* 1993, 341: 647-657.
6. Magnar L. The History of The Term "Tuberculosis". <http://www.angelfire.com/dc/orvostortenet/tuberc.html/22.9.2004>
7. Worbus M. "Captain of all these men of death". The History of Tuberculosis in Nineteent. *Bulletin of The History of medicine*, 2004, 78 (2): 489-490
8. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ, M.. "Manual of Clinical Microbiology" 17 Ed. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1999, s. 399-437
9. Koppelman J., Alçiçek C.M., Kazancı N., Schultz M., Özkul M., Şen Ş., Brief Communication: First *Homo erectus* from Turkey and Implications for Migrations Into Temperate Eurasia, *American Journal of Physical Anthropology*, 2008, 135: 110-116.
10. Daniel TM, Bates JH, Downes KA. History of Tuberculosis. In bloom BR, Editor: *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, Washington, DC, ASM Pres 1994, s.13-24
11. Uzluk F.N. Tüberkülozun Doğu Kaynaklarına Göre Tarihçe: Tüberküloz ve Toraks, 1954, 2-12.

12. Ülgenalp I. Tüberküloz Bakteriyolojisi 1. Baskı, İstanbul, 1984
13. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı Ankara 2003.
14. Sontag S. Bir Metafor Olarak Hastalık (Çev. İsmail Murat), BFS Sanat Yayınları: 1988 İstanbul.
15. Metintaş, M. Tüberküloz basilinin yapısı ve özellikleri, Ed. Özdemir, N. Anadolu Solunum Derneği yayınları , Eskişehir, 1997, 17-31.
16. John C., Norman H. Fred M. Çev. Koçyiğit, Dağlı E. “Klinik tüberküloz” İstanbul, 1995, s.1-25.
17. Ceyhan İ. Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı. Teknik Seri. RSHM. LAB. TB.01 Ed.. 2007; s.16–17.
18. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, Editör Enfeksiyon Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevi 1996:s. 396–454.
19. Sabar İ. Tüberküloz Tarihçesi, İstanbul, Kemal Mtb 1956,s.7-49.
20. Kıyan M. Mycobacteriaceae. “Temel ve Klinik Mikrobiyoloji” (Ed.Ustaçelebi Ş)’ de. Güneş Kitabevi Ltd, Ankara 1999, s. 419-455.
21. Kocabaş A; Tarihsel Gelişim Sürecinde Tüberküloz, Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü, Ankara, Emel Matbaası, 1991, 33–7, 243-62
22. Saygın, N. Mikobakteriler, Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü, Ankara, 1991, 41–5.
23. Pyffer GE, Von Graevenitz A. The Microbiology of *M. tuberculosis*. In Wilson R. Editor: European Respiratory Monograph Tuberculosis, UK, European Respiratory Society Journals Ltd 1997; 14–29)
24. Kocabaş A. Akciğer Tüberkülozu için G. Ünal S. Biberoğlu K. Akalın S. ed. Temel İç Hastalıkları, İstanbul, Güneş Kitabevi, 1996, s.456–75.
25. Jeager H. Klinik Sendromlar ve Tüberküloz olmayan mikobakterium Enfeksiyonu Tanısı, Tüberküloz. Çev Tetikkurt C. Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı Yayınları: 23, İstanbul 1995, s. 225-234.

26. Alp A. Balgam örneklerinden *Mycobacterium tuberculosis* izolasyonunda cetylpridinium chloride (CPC) ve %0,3'lük sodium hydroxide (NaOH)'in etkisi, Ankara: Atatürk Göğüs Hastalıkları Hastanesi, 2007
27. Besra GS and Chatterjee D. Lipids and Carbohydrates of *M. tuberculosis*. In Bloom BR, Editor: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, Washington, DC, ASM Press 1994; 285–305.
28. Walker, D.A. Taylor, I.K. Mitchell, D.M., Shaw, R.J.: Comparison of PCR Amplification of Two Mycobacterial DNA Sequences, IS6110 and The 65kDa Antigen Gene, in The Diagnosis of Tuberculosis, Thorax; 47: 690-4.
29. Young, D.M. Garbe, R.T. Heat Shock Proteins and Antigens of *M. tuberculosis*, Infection and Immunity. 59(9): 3083.
30. Özşahin, S.L. Tüberküloz Bakteriyolojisi, Türkiye Klinikleri Tıp Dergisi; 1994, 14(6): 404–408.
31. McFadden J. Stok ER.N.: Mycobacteria, Ed: Meyers, RA: Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive desk reference, VCH Publishes, New York, 1995, 582-585.
32. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenber PC, Winn WO, mycobacteria. In Koneman WE, Editor: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Ed. New York, Lipincott 2006, 1064–1124.
33. Brennan PJ and Draper P. Ultrastructure of *M. tuberculosis*. In Bloom BR, Editor: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, Washington, DC, ASM Pres 1994; 271–283.
34. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, Editör Enfeksiyon Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevi 1996:s. 396–454
35. Brennan PJ and Nikaido H. The Envelope of Mycobacteria. Annu Rev Biochem. 1995;64. 29–63.
36. Mcfadden . Mycobacteria. R.A.: Molecular Biology and Biotechnology: a comprehensive desk reference, VCH Publishers, New York, 1995, s. 582-585.

37. Anon, *Mycobacterium tuberculosis*'in hücre duvarı, <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/images/u1fig11.jpg>, 26 Ocak 2008.
38. Gedikoğlu S. M. Tuberculosis'in hücre yapısı. *İnfeksiyon Dergisi* (suppl11) : 1998, 13-18.
39. Özdemir Ö. Tüberkülozda Tanı Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 1994; 14. 420–424.
40. Bayındır Ü, Akciğer tüberkülozunun Radyoloji. In: Kocabaş A.(ed). *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*. Emel matbaası, Adana 1991; 219–226.
41. Schluger NW, Rom WN. Current approaches to the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149: 264-67.
42. Keleşoğlu N. Tüberküloz Tanısında Bakteriyolojik Yöntemler. In: Kocabaş A (ed). *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*. Emel matbaası, Adana, 1991;211–7.
43. Ülgenalp I. Tüberküloz Bakteriyolojisi 1. Baskı, İstanbul, 1984
44. Çavuşoğlu C. Tüberküloz Tanısında Laboratuar Yöntemleri. In: Aysan T (ed). *Türkiye Klinikleri Göğüs Hastalıkları Dergisi* 2003; s: 36–45.
45. Anon, *Mycobacterium tuberculosis*' in mikroskopta ARB Boyama sonucu görüntüsü, [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/71/Mycobacterium\\_tuberculosis\\_Ziehl-Neelsenstain\\_02.jpg/800pxMycobacterium\\_tuberculosis\\_Ziehl-Neelsen\\_stain\\_02.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/71/Mycobacterium_tuberculosis_Ziehl-Neelsenstain_02.jpg/800pxMycobacterium_tuberculosis_Ziehl-Neelsen_stain_02.jpg), 26 Ocak 2008.
46. Akçay Ş. Ekim N. Tüberkülozun Tanısında Yeni Yöntemler, *Solunum Hastalıkları*. 1994;5.159–164.
47. Özsöz A. Basil Pozitif Hastanın Yönetimi. In: Aysan T. (ed). *Türkiye Klinikleri Göğüs Hastalıkları Dergisi* 2003; 50–4.
48. Anon, Colonies of *M. tuberculosis* on Löwenstein-Jensen medium. CDC <http://www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>\_Alıntı Tarihi: 26 Aralık 2008.

49. Kocabaş A. Günümüzde ve Gelecekte Tüberküloz Tanısı. In: Kocabaş A (ed). Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Emel matbaası, Adana, 1991; 243–62.
50. Woodhead M. New approaches to the rapid diagnosis of tuberculosis. Thorax 1992;47–264.
51. Anon, Merck Fiyat Listesi (pdf) <http://elcikimya.com/merck.htm>. Alıntı Tarihi : 26 Aralık 2007
52. Anon, İstanbul Hali Sebze, Meyve Fiyatları, <http://www.gidasanayii.com/modules.php?name=News&file=article&sid=12481> Alıntı Tarihi: 26 Aralık 2007.
53. Anon, Voigt Global Distribution Inc. [http://www.vgdinc.com/spreadsheets/Difco\\_Dehydrated\\_Media\\_and\\_Additives.pdf](http://www.vgdinc.com/spreadsheets/Difco_Dehydrated_Media_and_Additives.pdf) Alıntı Tarihi: 26 Aralık 2007.
54. Rızwan M. Yogesh K. S. and T.A. Venkatasubramanian, Metabolism of mycobacteria, *J. Biosci.*, Vol. 7, Numbers 3 & 4, June 1985, pp. 421–431.
55. Anon, Besinler ve Özellikleri, <http://www.Sagliksayfam.com/besinler-ve-ozellikleri/havuc.html>, Alıntı Tarihi: 26 Aralık 2008.
56. Maccabe A. F. ve Gould J. C. The rapid isolation of Mycobacterium Tuberculosis on a culture medium, Journal of Clinical Pathology, 1954, 7-45.
57. Dunlop G.A. ve Lowe, B.D. A compariason of blood and egg media for the rapid isolation of *M. tuberculosis*. J Clin. Path. 1955; 8,-300.
58. Basaca-Sevilla V. The utilization of the coconut watter egg malachit gren medium (CEM) for the isolation of *Mycobacteium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*. Phil J Microbiol Infect Dis 1981; 10 (2): 93–97.
59. Murice S. Tarsis, Patricia C. Kinsella and Malcolm V. Parker. Blood media for the cultivation of *M. tuberculosis*. J. Bacteriol., Vol. 66, Issue 4, 448-452, October 1, 1953.

## 10. EKLER

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarımda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve beni yönlendiren Sayın Hocam Prof.Dr. Ufuk ABBASOĞLU'una, birçok konuda yardım ve desteğini gördüğüm Doç.Dr. Şeref Özkara'ya, tezimin her aşamasında yardımcı olan Arş. Gör. Selda ÖZGEN'e, Arş. Gör. Dr. Fatma Kaynak Onurdağ'a, Uzm. Bio Buket Er'e, eğitimim her aşamasında bana destek olan ve yüreklendiren annem Neriman İPEK ve babam Mutallip İPEK'e, bana gösterdiği anlayıştan dolayı da eşim Eren ÇELİK'e içtenlikle teşekkür ederim.

## 11.ÖZGEÇMİŞ

**Adı** : Şefika  
**Soyadı** : İpek  
**Doğum yeri ve yılı** : Wipperverth, 15 Haziran 1975  
**Eğitim** : 1987, Almanya'da İlkokul  
1990, Edirne-Keşan Cumhuriyet Ortaokulu,  
1994, Tekirdağ Sağlık Meslek Lisesi  
Parasız Yatılı,  
1996, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu-Hemşirelik Bölümü  
2001, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü,  
2004, Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Alan Öğretmenliği tezsiz Yüksek Lisans,  
2007, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Yükses Lisans  
**Yabancı dil** : İngilizce orta düzeyde  
Almanca orta düzeyde  
**Görevi** :1994-2005 Ankara Onkolojisi Hastanesi  
2005-2008 Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı