

**T.C  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI  
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Filiz AKATA

**MİKROBAKTERİ TÜRLERİNİN MOLEKÜLER  
METOTLA BELİRLENMESİ**

(Doktora tezi)

**Hakan KUNDURACILAR**

Destekleyen Kurum :

Tez No : 24

EDİRNE - 2004

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
**Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Doktora Programı**  
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki Jüri tarafından  
**DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/02/2004



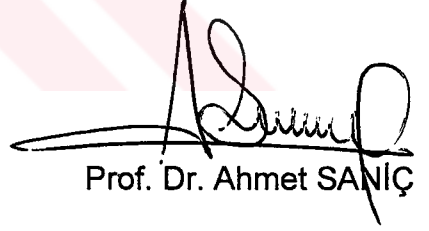
Prof. Dr. A. Metin OTKUN

JÜRİ BAŞKANI



Prof. Dr. Filiz AKATA

ÜYE



Prof. Dr. Ahmet SANIÇ

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.



Prof. Dr. Hakan KARAOĞ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü.

## TEŞEKKÜR

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimime başladığımdan bu yana yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, beni eğiten ve yönlendiren Prof. Dr Murat TUĐRUL'a, çok değerli bilgilerinden faydalandığım danışman hocam Prof. Dr. Filiz AKATA'ya, tezimin her aşamasında ve tamamlanmasında katkısı olan Yrd.Do c Dr Özlem TANSEL'e, tezimin moleküler metot kısmının çalışma prensiplerini öğreten Prof Dr.Ahmet SANIC ve Veteriner Hekim Ilker URUK'a, çalışmalarım sırasında yardımlarını aldığım Prof. Dr. Metin OTKUN'a, ve Anabilim dalındaki mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>KORD OLUŞTURMA</b> .....	9
<b>NAP ( p-Nitro-<math>\alpha</math>-Acetylamino-<math>\beta</math>-Hydroxypropiopheone ) Deneyi</b> .....	9
<b>PCR ( Polimeraz Zincir Reaksiyonu)</b> .....	13
<b>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</b> .....	15
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	17
<b>BULGULAR</b> .....	31
<b>TARTIŞMA</b> .....	40
<b>SONUÇLAR</b> .....	45
<b>TÜRKÇE ÖZET</b> .....	47
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b> .....	49
<b>KAYNAKLAR</b> .....	51
<b>RESİMLEMELER LİSTESİ</b> .....	54
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	55

## SİMGE VE KISALTMALAR

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
CDC	Center for Disease Control and Prevention
EZN	Ehrlich-Ziehl- Neelsen
FDA	U.S.Food and Drug Administration
GI	Üreme indeksi (Growth Index)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
<i>IS</i>	<i>Insertion Sequences</i>
MOTT	Mycobacteria Other Than Tuberculosis
MTK	Mycobacterium tuberculosis kompleksi
NAP	p-Nitro- $\alpha$ -Acetylamino- $\beta$ -Hydroxypropionophenone
ORFs	Open Reading Frames
PANTA	Polimiksin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Amfoterisin B, Azlosilin
PRA	PCR-RFLP Analizi
PCR	Polymerase Chain Reaction
POES	Polioksietilen Stearat
PFGE	Pulsed Field Gel Elektrophoresis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RE	Restriksiyon enzimleri
Taq	Thermus aquaticus

## GİRİŞ VE AMAÇ

Ülkemizde mikobakteri türlerinin dağılımını gösteren uzun süreli bir çalışma yoktur. İstanbul'daki mikobakteri türlerinin dağılımını kısmen yansıtabilecek bir çalışmada biyokimyasal testler, NAP (p-Nitro- $\alpha$ -Acetylamino- $\beta$ -Hydroxypropionophenone) testi ve bakterinin kord oluşturma özelliği karşılaştırılmış, moleküler metotlardan *hsp65* geninin Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism PCR-RFLP (PCR-RFLP) analizi (PRA) metodunun daha ucuz ve hızlı olduğu için kullanılabileceği vurgulanmıştır (1). Konuyla ilgili dış ülkelerden yapılan yayınlar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda moleküler metotların diğer metotlara göre hızlı ve güvenilir olduğu belirtilmiştir (2-7).

Kord faktör'de denilen 6'-6' dimikolat trehaloz, bakterinin tween-albumin besiyerinde, 37 °C'de, 10-15 gün içinde çalı demetine benzer görünüm almasından sorumludur. Katı besiyerlerinde koloni morfolojisi değerlendirmesi ne kadar zor ve yanıltıcı ise, sıvı besiyerinde kord oluşturma değerlendirmesi de o kadar kolay, hızlı, pratik ve ucuzdur (1,8-10).

Mikobakteri türlerinin identifikasyonu için sıvı besiyeri içeren BACTEC 12B şişesinden NAP testi yapılmaktadır. NAP, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) kompleksin (MTK) üremesini inhibe ederken MOTT (Mycobacteria Other Than Tuberculosis) türlerinin üremesini etkilemeyerek kabaca identifikasyon sağlamaktadır. Ancak MOTT türlerini alt gruplara ayırmada kullanılamamaktadır. Test ortalama beş günde tamamlanır, ayrıca pahalıdır. MOTT türlerinin hızlı identifikasyonu, hastanın kliniğini değerlendirmede ve uygun tedaviyi seçmede yol göstericidir (1).

Isı şok proteinleri, ısıdaki ani artış veya diğer çevresel strese karşı cevapta sentezlenen proteinlerdir. Bilinen tüm mikobakteri türlerinde olan 65 kDa ısı şok proteininin *hsp65* genindeki dizilim farkları hem yavaş hem de hızlı üreyen mikobakteri türlerinin saptanmasında kullanılabilir (6). *Hsp65* geni, 16 S rRNA gen dizilimine göre daha değişken, bu nedenle genetik olarak ilişkili türlerin ayırımında daha kullanışlıdır. 16S rRNA geninin RFLP analizinde üç veya beş farklı enzim gerekirken *hsp65* PRA metodunda sadece iki restriksiyon enzimi yeterlidir (11).

PRA metodu bütün mikobakteriler için ortak olan primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününün restriksiyon enzim analizine dayanır. Bu moleküler metot sıvı besiyerinde üreyen kültürlerle uygulanabilmekte ve bir günde sonuçlanmaktadır, mikobakterileri tür düzeyinde tanımlamak için standart bir metoddur, hibridizasyon, türe özgül prob, radyoaktivite gerektirmez (6,7,11-13)

Bu araştırmada kord faktör ve NAP testi ile MTK ve MOTT tanısı konmuş mikobakterilerin PRA metodu kullanılarak doğrulanması ve aynı zamanda MOTT olarak kabul edilen türlerin tanımlanması amaçlanmıştır. NAP testiyle 3-5 günde sonuç alınırken, bu metotla 1 günde sonuç alınabilmektedir.

Böylece hem kord faktör hem de NAP testi sonuçları moleküler metotla doğrulanacak ve aynı zamanda hızlı, kolay, en doğru sonucu veren metot belirlenerek mikobakteri tür tanımlanması yapılacaktır.

## GENEL BİLGİLER

Tüberküloz, insanlık tarihinin en eski ve en çok korkulan hastalıklarından biridir. Uygarlığın başlangıcından bu yana var olan ve muhtemelen de sonuna dek beraber olacak bir hastalıktır. Bakterinin paleolitik çağda, insanları infekte etmeden önce, hayvanlar arasında yaygın olarak bulunduğu tahmin edilmektedir (14).

Dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ünün *M. tuberculosis* ile infekte olduğu ve her yıl 3 milyon civarında kişinin ölümüne neden olduğu bilinen tüberküloz başta az gelişmiş ülkeler olmak üzere dünyanın her yerinde görülebilen bir enfeksiyondur. Enfeksiyona karşı yapılan yoğun mücadeleler sonucu bir ara dünyada görülme oranı giderek düşmüş ancak 1980'li yılların sonuna doğru Türkiye'de ve dünyada tekrar artış göstermiştir. Kalabalık yaşam koşulları, uyuşturucu ve alkol bağımlılığı, fakirlik, kötü beslenme, immün sistem bozukluğu ve özellikle batı ülkelerinde ortaya çıkan " Acquired Immunodeficiency Syndrome " (AIDS), tüberküloz olgularının artışında önemli rol oynamıştır. Yaşının 300 milyon olduğu bilinen *M. tuberculosis*, doğada, toprakta, sulara, çayırdaki ve çimenlerde, petrol atıklarında bol olarak bulunmaktadır.

Mikobakteriler tarih boyunca olduğu gibi günümüzde de salgınlara yol açmakta, yeni epidemiyolojik tipler veya ilaçlara dirençli mikroorganizmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüberkülozun kontrolü için erken teşhis esastır. Günümüzde tüberküloz tanısında en kolay ve hızlı metot aside dirençli basillerin Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyasıyla gösterilmesidir. Bununla beraber boyama ve yayma mikroskopisi için ml'de 5000-10000 bakteri gerekmektedir. Tedavi edilmemiş hastalarda yapılan çeşitli çalışmalarda tüberküloz hastalarının % 50-80'inde yayma pozitifliği gösterilebilmiştir (15). Günümüzde hala altın standart kültürdür. Kültür



balgam, bronş lavajından başka beyin omurilik sıvısı ve idrar gibi solunum sistemi dışı örneklerde de rahatlıkla kullanılabilir. Kültür aynı şekilde yaymadan yaklaşık 500 kez daha duyarlıdır ve duyarlılık saptanması gibi daha ileri araştırmalar için bakteriyi de sağlar. Mikroskopi ve kültür gibi klasik tanı yöntemleri mikobakterilere bağlı infeksiyonların tanısında önemini eskisi gibi korumakla birlikte daha uzun zaman almakta ve yeni etkenlerin tanımlanmasında yetersiz kalabilmektedir (15).

Mikobakteriler aerobik, spor oluşturmeyen, hareketsiz, kapsülsüz basillerdir. Hafifçe kıvrık veya düz, 0.2-0.6 µm eninde, 1.0-10.0 µm boyunda nadiren dallanma gösterebilen mikroorganizmalardır. İpliksi veya miçelyum benzeri bir üreme tarzı olabilir, fakat bu ipliksi yapılar kolaylıkla çomak veya kokobasiller elemanlara parçalanır. Mikobakterilerin hücre duvarı, dallanmış ve uzun zincirli mikolik asitlerin varlığına bağlı olarak lipidçe zengin tabiattadır (14).

Lipidçe zengin hücre duvarları diğer bakterileri boyamada kullanılan anilin boyaların penetrasyonunu engeller. Bu yüzden mikobakteriler Gram pozitif özellikte olmalarına rağmen, Gram boyama yöntemi ile kolay boyanmaz. Anilin boyaların hücre duvarından geçebilmesini sağlamak için fenol veya ısı ile birlikte fenol kullanılır. Yine aynı sebeple (lipidçe zengin, kalın hücre duvarı) hücre duvarına nüfuz eden boyanın uzaklaştırılması da zordur. Dekolorizasyon (renk giderme) işlemi diğer bakterilerde sadece alkolle yapılabilirken mikobakterilerde asit-alkolle yapılır, asit kullanımına rağmen ilk boya (Ziehl-fuksin) hücre duvarında kalır. Bu özellikleri "aside dirençlilik" olarak tanımlanır. Ancak aside dirençli boyanma özelliği her mikobakteri türünde aynı değildir. Özellikle hızlı üreyen mikobakteri türleri bazen aside dirençli gözükmebilirler, bazen de bakterilerin çok az bir kısmı sadece bazı mikroskop alanlarında aside dirençli boyanır (16).

Tüberküloz bakterilerinin elektron mikroskopuyla yapılan incelemeleri; sitoplazma içinde bol miktarda ribozom, polifosfat granülleri, vakuoller, lipid damlacıkları ve kitle şeklinde fibriler bir DNA bulunduğunu, üç katlı plazma membranının üç katlı bir hücre duvarı ile çevrildiğini ortaya koymuştur. Hücre duvarının plazma membranına bağlanması fosfatidil inositol mannosid tarafından sağlanır. Hücre duvarının iskeleti, peptidoglikan ve arabinogalaktan oluşur. Peptidoglikan tabakada N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit, arabinogalaktan tabakada ise D-arabinoz, D-galaktoz ve mikolik asit bulunur. Bu iki tabaka D-arabinoz ve N-asetil muramik asit arasındaki fosfodiester köprüleri ile birbirine bağlanır. Mikobakterilerde lipopolisakkarit yan zincirler daha özgül olup terminal uçlarından

uzun zincirli yağ asitlerine bağlanmışlardır. Yağ asitleri hücre duvar kalınlığından ve büyük oranda aside dirençli boyanma özelliğinden sorumludur. Serbest lipidlerden biri olan Wax D, immunoadjuvan aktiviteye sahip olmasından dolayı özel öneme sahiptir. Kord faktörde denilen 6'-6' dimikolat trehaloz, bakterinin tween-albumin besiyerinde, 37 °C'de, 10-15 gün içinde çalı demetine benzer görünüm almasından sorumludur. Sulfatid ve sulfatid açıl trehalozlar, makrofaj içinde fagozomla lizozimin birleşmesini engelleyerek virulansta rol oynar. Tüberküloz basillerinin hücre kuru ağırlığının % 60'ı lipidlerden oluşur (14).

*Mycobacterium* cinsi (genusu), Eubacteria üst aleminin (superregnum), Firmicutes bölümünün (divisio), Actinomycetes sınıfının (classis), Mycobacteria takımının (ordo), *Mycobacteriaceae* ailesine (familia) dahildir ve bu ailedeki tek cinstir.

*Mycobacterium* cinsi, bilimsel literatüre ilk olarak 1896'da girmiştir. Bu cins içinde bugün 80'den fazla tür tanımlanmış olmakla birlikte, 1950'lere kadar bilimsel çevrelerin ilgisi, esas olarak klinik önemi nedeniyle, üç tür (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.leprae*) üzerinde yoğunlaşmıştır (17).

İnsan ve diğer sıcak kanlı hayvanlarda hastalık oluşturan *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* ve *M. microti*'nin birbirleriyle gösterdikleri genetik yakınlık temel alınarak bu türler, "M.tuberculosis complex " adı altında toplanmışlardır (17).

Yirminci yüzyılın başında *M. tuberculosis*, *Mycobacterium* cinsinde insanlarda hastalık yaptığı bilinen tek türdü. Daha sonraları insanlarda hastalık yapan diğer mikobakteriler bulundu ve atipik olarak adlandırılmaya başlandılar. Bu grup "Mycobacteria Other Than Tuberculosis" (MOTT) (tüberküloz harici diğer mikobakteriler) olarak da isimlendirildi. Bu grupta 70 civarında mikobakteri türü bilinmektedir.

MTK içinde yer alan türlerin bir özelliği, trehaloz-6',6'dimikolat maddesi varlığına bağlı olarak sıvı besiyerlerinde uzun kordonlar oluşturmalarıdır. Katı besiyerlerinde koloni morfolojisi değerlendirmesi ne kadar zor ve yanıltıcı ise sıvı besiyerinde kord oluşturma değerlendirmesi de o kadar kolay, hızlı, pratik ve ucuzdur. Kord oluşturan bakterilerin yüzlerce hatta binlercesi bir araya gelerek geniş bakteri kümeleri meydana getirirler. Ancak bu kümeler bakterilerin rastgele üst üste veya yan yana yığılması ile oluşmuş düzensiz kümeler şeklinde değildir. Tam tersine kordon içinde yer alan her bir bakterinin uzun ekseni kordonun uzun eksenine paralel olacak şekilde dizilirler ve mikroskopik incelemede kordonun içine bakıldığında bu

muntazam yapı hemen fark edilir Kord faktör oluşturma özelliğine göre MTK suşları, MOTT suşlarından ayırt edilebilir ve bu nedenle kord oluşumu hızlı bir ön tanımlama aracı olarak kabul edilmiştir (8,9,18-20).

Atipik mikobakteriler üreme hızlarına göre yavaş ve hızlı üreyenler olarak iki büyük gruba ayrılmaktadır. Yavaş üreyenlerin kolonileri yedi günden daha uzun bir sürede gözle görünür hale gelirken, hızlı üreyenlerin kolonileri besiyerlerinde 7 gün ve daha kısa bir zamanda gözle görünür hale gelir (21). Bu ayırım yapılırken asla primer izolasyon besiyerindeki üreme hızları baz alınmaz, zira materyal ekilmeden önce uygulanan dekontaminasyon işlemleri, tedavi altındaki hastaların kullandıkları antimikrobiyal ilaçlar ve muayene maddesinin içerdiği olası üreme inhibitörleri üreme süresinin uzamasına yol açar, bu şekilde aslında hızlı üreyen gruba dahil olan bir mikobakteri suşunun yavaş üreme özelliğinde bir suş olduğu zannedilebilir. Tam tersi yönde hatalarda mümkündür; gerçekte yavaş üreyen gruba dahil bir mikobakteri suşu bir muayene maddesi içinde çok bol miktarda mevcut ise çok kısa bir süre (Örn. 3-5 gün) içinde üreyebilir. Dolayısıyla bir mikobakteri suşunun üreme hızına ilişkin karar, ekim öncesi suşun inokulum miktarının seri dilüsyonlarla ayarlandığı, bu şekilde primer üretim besiyerindeki inhibitörlerin giderildiği veya büyük ölçüde minimize edildiği, Löwenstein-Jensen (L-J) besiyerine yapılan pasajlarında verilir (1).

Yavaş ve hızlı üreyen olmak üzere iki ana gruba ayrılan mikobakteri suşlarının yavaş üreyenler grubuna dahil olanları, katı besiyerinde pigment oluşturma özellikleri değerlendirilerek üç alt gruba ayrılır; pigment oluşturmayanlar (nonfotokromojenler), hem karanlıkta hem de aydınlıkta pigment oluşturanlar (skotokromojenler), karanlıkta üredikleri sürece pigment oluşturmayıp, sadece ışığa maruz kaldığında pigment oluşturanlar (fotokromojenler). Bu şekilde Runyon mikobakterileri üreme hızı ve pigment oluşturma özelliklerine göre dört gruba ayırmıştır (21).

1. Fotokromojenler (Runyon Grup I): *M.kansasii*, *M.asiaticum*, *M.marinum*, *M.intermedium*, *M.simiae*

2. Skotokromojenler (RunyonGrup II): *M.szulgai*, *M.xenopi*, *M.scrofulaceum*, *M.interjectum*, *M.gordoniae*, *M.flavescens*, *M.lentiflavum*

3. Nonfotokromojenler (Runyon Grup III): *M.avium-intracellulare*, *M.celatum*, *M.genavense*, *M.haemophilum*, *M.malmoense*, *M.shimoidei*, *M.ulcerans*, *M.branderi*.

4. Hızlı üreyenler (Runyon Grup IV): *M.fortuitium*, *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.mucogenicum*, *M.peregrinum*

Bazı eksikliklerine rağmen Runyon'un gruplandırması bugün dahi biyokimyasal yöntemin ana akış şemasını oluşturmaktadır. Zira her üretilen mikobakteri suşu önce Runyon'un belirttiği gibi dört gruptan birine ayrılır, sonra her grupta yer alan türlerden hangisine ait olduğuna biyokimyasal deneylerle karar verilir.

Klinik önemi olan mikobakteriler şunlardır (14).

Patojen	<i>M.tuberculosis, M.bovis, M.ulcerans</i>
Sıklıkla patojen	<i>M.kansasii, M.marinum</i>
Potansiyel patojen	<i>M.avium-intracellulare, M.fortuitum, M.chelonae, M.simiae, M.scrofulaceum M.szulgai, M.xenopi, M.malmoense M.abscessus, M.haemophilum, M.aciaticum M.genavense</i>
Saprofit (nadiren patojen)	<i>M.gordonae, M.gastri, M.flavescens, M.vaccae, M.terrae, M.trivale, M.phlei M.smegmatis, M.thermoresistibile</i>

Genel olarak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının tanıya yönelik temel hedefi, gönderilen muayene maddelerinde veya çevresel örneklerde etyolojik ajanların varlığını saptamak ve sonra identifikasyonunu yapmaktır. Taksonomi bilimi ise, bu mikroorganizmaların identifikasyonu, sınıflandırılması (klasifikasyonu) ve isimlendirilmesi (nomenklatür) ile uğraşır.

Taksonomik yöntemler başlıca 4 gruba ayrılır (1).

a. Fenotipik yöntemler: Koloni morfolojisi, Gram boyanma özelliği, EZN boyama, biyotiplendirme, kromojenik enzimatik reaksiyonlar, antibiyotiplendirme, kolisin tiplendirmesi, faj tiplendirmesi v.b.

b. Serolojik yöntemler: Serolojik analiz, "immunoblotting" v.b.

c. Analitik yöntemler: Hücre duvarı bileşiklerinin analizi, membran veya tüm hücre lipid analizi v.b.

d. Moleküler yöntemler: G+C oranı, RFLP, ribotiplendirme, "Pulsed Field Gel Elektrophoresis" (PFGE), DNA-DNA hibridizasyonu, rRNA dizi analizi, IS6110, "spoligotyping" v.b.

Taksonomide kullanılan yöntemlerin bir kısmı klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında uzun süredir kullanılmaktadır, bazıları ise yüksek ilk yatırım ve

karmaşık teknikler gerektirmesi, zaman alıcı olması dolayısıyla ve yetişmiş personel gerektirdiği için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına son yıllarda girmiştir.

Mikobakteri türlerinin taksonomik sınıflandırmasında ise fenotipik karakterlerin belirlenmesi önemli yer tutar. *M. tuberculosis*'de ikiye bölünme süresi 15-20 saat (ortalama 18 saat)'dir. Kesin olmamakla birlikte bunun, DNA dependent RNA polimeraz enzim defektine bağlı olduğu sanılmaktadır. Bu nedenle tüberküloz basillerinin katı besiyerinde kolonilerinin görülebilmesi için en az 2 hafta geçmesi gereklidir. *M. tuberculosis*, yumurtalı besiyerlerinde (Löwenstein-Jensen) 37 °C'de, 2-3.haftada, üstü ve kenarları girintili çıkıntılı, kuru, sert, kirli beyaz veya deve tüyü renginde 1-2 mm çaplı pigmentsiz koloniler oluşturur. Zamanla koloniler büyür, birbirleriyle birleşir, daha düzensiz ve daha kuru bir hal alır. İçinde gliserin bulunan sıvı besiyerlerinde zorunlu aerop olmasından dolayı zar oluşturarak ürer. Yarı-katı besiyerlerinde, yüzeyde ince tabaka halinde ürer (14).

Mikobakterilerin üretilmesinde yumurtalı (Löwenstein-Jensen, Petregnani, Trudeau), ve agarlı (Middlebrook 7H10 ve 7H11, Dubos oleik asit-albuminli agar) bir çok besiyeri kullanılır (14).

Genus içinde yer alan bakterilerin, boyanma karakterleri en belirgin özelliklerinden birisidir. Mikroskopik incelemede kullanılan EZN boyama yöntemi, yeni olguların tesbiti, tedaviye cevabın izlenmesi, ilaca dirençli vakaların ortaya konması ve hastaneden çıkarma gibi bir çok konuda önemli ipuçları verir. Aside dirençli bakteriler mavi zeminde, parlak kırmızı olarak görülür. Karşıt boyamada metilen mavisi yerine pikrik asit kullanılırsa zemin sarı renkte, malaşit yeşili kullanılırsa yeşil renkte boyanır. Eski kültürlerden ve kronik hastaların klinik örneklerinden hazırlanan preparatlarda; bakteri sitoplazmasında bulunan polifosfat granülleri ve vakuollerin değişik derecelerde boya almaları nedeniyle, basiller düzensiz şekilde boyanıp, boncuk dizisi veya tesbih tanesi şeklinde görülür. Tedavi ile önce kültür, sonra yayma negatifleşir. Tedaviye rağmen preparattaki bakteri sayısında azalma olmaması, ilaç direncini düşündürür. Bu sebeplerden dolayı yaymalar dikkatli bir şekilde incelenmeli, görülen basil sayısı Centers for Disease Control and Prevention (CDC) kriterlerine göre rapor edilmelidir (14).

Klinik örneklerdeki mikobakterilerin gösterilmesinde florokrom boyama yöntemlerinden de (auramin-fenol, auramin-rodamin, Glikerson-Kanner yöntemi v.b) yararlanılır. En sık kullanılan auramin-rodamin boyamasıdır. Aside dirençli bakteriler parlak sarı, zemin siyah renkte görülür (14).

Fenotipik özellikleri esas alan yöntemlerden, kord oluşturma ve NAP testi de mikobakteri identifikasyonu için kullanılmaktadır.

## **KORD OLUŞTURMA**

Pozitif BACTEC 12 B şişelerinden hazırlanan ve EZN yöntemiyle boyanan preparatlar x 1000 büyütmeye incelendiğinde, preparatta görülen aside dirençli bakterilerin gelişi güzel, düzensiz bir araya gelmiş bakteri yığınları şeklinde değil de kordonlar oluşturacak şekilde ve her bir kordonu oluşturan yüzlerce hatta binlerce basilin her birinin uzun ekseninin kordonun uzun eksenine paralel olması, böylelikle kordonun iç yapısının son derece düzenli gözükmesi durumunda, bir mikobakteri suşunun kord oluşturma özelliğine sahip olduğundan bahsedilir. Bu şekilde uzun kordonlar oluşturabilme özelliği *M. tuberculosis* kompleks türlerinin hücre duvarında varolan trehaloz-6',6'-dimikolat maddesinin varlığına bağlanmıştır. Bu sebeple kord oluşturma özelliği temel olarak *M. tuberculosis* kompleks'e ait bir özellik olarak kabul edilir. Nadiren bazen *M.kansasii*, *M.avium-intracellulare* kompleks (MAI), *M.terrae*, *M. phlei*, *M.szulgai*, *M.chelonea*, *M.gordoniae* ve *M.marinum* suşlarının kord oluşturduğu bildirilmiş ise de bunların değerlendirme hatasından mı, yoksa bazı MOTT türlerinin bazı suşlarında trehaloz-6',6'-dimikolat maddesinin sentezlenmesine mi bağlı olduğu açıklık kazanmamıştır (1,8-10).

## **NAP (p-Nitro- $\alpha$ -Acetylamino- $\beta$ -Hydroxypropiopeone) DENEYİ**

Mycobacterium cinsinin en sık rastlanılan, en önemli patojen türleri *M. tuberculosis* ve daha az oranda da olsa *M.bovis* ve *M.bovis* BCG, *M.microti* ve *M.africanum* olduğundan, klinik laboratuvarlarda *M. tuberculosis* kompleks suşlarını diğer MOTT suşlarından ayırt etmek tedavinin yönlendirilmesi, hastanın hastaneye yatırılmasına karar verilmesi açısından değer taşır. Bu nedenle *M. tuberculosis* kompleks suşlarını inhibe eden ancak MOTT türlerini inhibe etmeyen, böylelikle sınırlı bir identifikasyon sağlayan bazı kimyasal maddeler kullanılmıştır; p-nitrobenzoat, hidroksilamin hidroklorür, 8-azaguanin, nitroksolin ve NAP bunlardan bazılarıdır. NAP kloramfenikol sentezinde bir ara ürün olmakla beraber, *M.tuberculosis*'e kloramfenikole göre dört kat etkindir. Çoğul dirençli tüberküloz olgularının tüm

dünyada ciddi bir sorun olmaya başlamasıyla bu klasik ve yavaş deneylerin daha hızlı radyometrik BACTEC yöntemine göre adapte edilmesine çalışılmıştır (1).

Biyokimyasal mikobakteri identifikasyon deneyleri, mikobakteri taksonomisi ile ilgili çalışmalarda hala önemini korurken, klinik laboratuvarlarda yakın zamana kadar geleneksel olarak kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen yöntemdi. Ancak metodolojisinin çok emek gerektirmesi, 3-10 hafta gibi uzun sürelerde sonuçlanması, suşların fenotipik değişkenlik göstermesi, fenotipik homojenite ve düşük tekrarlanabilirlik göstermesi rutin klinik laboratuvarlarını daha kolay, hızlı, güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği daha yüksek olan moleküler biyolojik identifikasyon yöntemlerine yöneltmiştir (22).

Analitik yöntemlerden olan hücre duvarı lipid içeriğinin ince tabaka kromatografisi, gaz-sıvı kromatografisi, High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) analizi ile mikobakteri türlerinin birbirinden ayırt edilmesi de mikobakteri taksonomisinde önemli bir yer tutar (23).

Mikolik asit analizi yeni mikobakteri türlerinin tanımlanması için birkaç minimal kriterden biri olarak önerilmiştir. Mikolik asitlerin HPLC analizi yöntemi ile bir çok mikobakteri türünün tanımlanması için hızlı ve güvenilir bir metot olarak gösterilmiştir (24).

Diğer taraftan en gelişmiş ve güvenilir taksonomik yöntemler olarak kabul edilen G+C oranı, DNA hibridizasyonu, 16S rRNA dizi analizi, kromatografi yöntemleri de dahil olmak üzere hiçbir taksonomik yöntem cins veya türleri ayırt etmek amacıyla tek başına kullanılabilecek yetkinlikte değildir. Bu yüzden yeni bir cins veya tür taksonomik sınıflandırmada yerini alır, isimlendirmeye dahil edilirken bu sayılan yöntemlerin birçoğu bir arada kullanılır (1).

Mycobacterium cinsi içinde yer alan türler DNA'larındaki yüksek G + C içeriği (% 61 - 71) ile diğer mikolik asit üreten bakterilere benzer; nitekim Nocardia türleri için bu oran % 64 - 72, Rhodococcus türleri için % 63 – 73, Gordonia türleri için % 63 – 69 arasındadır. (16).

Bundan 10 yıl kadar önce nükleik asit dizi analizi yöntemi sadece sınırlı sayıda mikobakteri referans merkezinde taksonomik amaçlarla kullanılırken, günümüzde otomatize cihazların geliştirilmesi sonucu gelişmiş ülkelerdeki sayısız merkezde rutin identifikasyon amacıyla kullanılmaktadır. (24).

DNA dizi analizi teknolojilerinin uygulanması bu organizmaların kendine özgü yavaş üremeleri nedeniyle mikobakteri identifikasyonu için büyük fayda sağlamıştır.

Hedef amplifikasyonu ve dizi analizinin otomatizasyonundaki yeni gelişmeler klinik laboratuvarlarda DNA dizi analizinin pratik olarak yapılmasına imkan sağlamıştır (24). Mikobakterilerin identifikasyonunda altın standart olarak düşünülen DNA dizi analizi en yüksek seviyede doğru sonuç veren güvenilir bir yöntem olmasına rağmen, manuel dizileme işleminin zorluğu ve deneyim gerektirmesi, otomatize DNA dizi analizi cihazlarının pahalı olması kullanımlarını sınırlandırmaktadır (25).

MTK içinde yer alan türler birbirleriyle % 85'in üstünde DNA-DNA homolojisi göstermektedirler. 16S rDNA' ları aynı olup, 16S-23S rDNA gen dizilimindeki boşluklarda (spacer) aynı yerlerde bulunmaktadır. Çok sayıda yapısal genin karşılaştırılmalı sekans analizleri MTK içinde yer alan 4 tür arasında minimal bir polimorfizm olduğunu ortaya koymuştur. Son yıllarda özellikle gen regülasyonu ve ekspresyonunu belirlemek üzere yeni geliştirilen "DNA microarrays" yöntemi, mikobakteri fizyolojisi ve biyolojisi alanlarında önemli gelişmelerin kaynağını oluşturacak gibi gözükmektedir. *M. tuberculosis* H37Rv standart kökeninin tüm genom diziliminin belirlenmesi, mikobakteriyal alandaki gelişmelerin en önemlilerinden birisidir. Genomun 4,411,529 baz çiftinden oluştuğu, %65.6 oranında G+C ve 3924 "open reading frames" (ORFs) içerdiği belirlenmiştir (17).

Geliştirilen moleküler teknikler sayesinde, MTK'da yer alan türlerin, "insertion sequences (IS), short repetitive DNA" sekansları gibi tekrarlayan DNA bölgelerinde yüksek derecede polimorfizm olduğu gösterilmiştir. Belirgin mobilitesi ve genomdaki ortalama kopya sayısının yüksekliği nedeniyle özellikle IS6110, genetik polimorfizmi saptamada en çok kullanılan belirteçlerden biridir (17).

PFGE metodu hızlı üreyen mikobakteriler için en yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. Farklı plazmid hareketleri bazı izolatlardaki bir yada iki banttaki farklılıkların bir nedenidir ve plazmidler için hızlı üreyen mikobakteri zincirlerinin görüntülenmesini sağlar (24).

INNO-LİPA teknolojisi "reverse hibridizasyon" esasına göre identifikasyon yapabilen bir DNA prob yöntemidir. Kit, sıvı veya katı besiyerlerinde izole edilen *Mycobacterium* türlerinin eşzamanlı olarak identifikasyonu amacıyla kullanılmaktadır. Hedef 16S ve 23S rRNA bölgesidir (25).

AccuProbe (Gen-Probe) *Mycobacterium* kültür identifikasyon testi, nükleik asit hibridizasyon yöntemi esasına dayalı bir rapid DNA prob testi olup, kültürden izole edilen MTK'nın yanı sıra *M. avium* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*'i yaklaşık 1-2 saat içerisinde tanımlayabilmektedir (25).



Son yıllarda ise bakteri gruplarının tür ve hatta alttür (subspecies) seviyesindeki ayırımları için 65 kDa'lık " heat shock proteini" ni kodlayan *hsp65* geni çok önemli ipuçları vermektedir (13). *hsp65* geninin 441 baz çift'lik bir fragmanının PCR yöntemi ile çoğaltılıp restriksiyon enzimleriyle kesilmesi - ki bu yöntem kısaca PRA yöntemi de denmektedir – ile *Nocardia*, *Actinomadura*, *Gordona*, *Rhodococcus* gibi diğer bazı aerobik *Actinomyecetes* cinsleri yanında *Mycobacterium* genusu içinde yer alan türlerin de sınıflandırılması mümkün olmuştur (7,12,13).

Moleküler biyolojik çalışmaların temeli Watson ve Crick'in 1953 yılında DNA molekül yapısını tanımlamalarına dayanmaktadır. DNA yapısı tanımlandıktan sonra ilerlemeler baş döndürücü bir hızla gelişmiştir. Ters transkriptaz (RNA'dan complementary DNA yapımı) enzimlerinin tanımlanması, restriksiyon endonükleaz enzimlerinin keşfi, klonlama teknolojisinin gelişmesi, DNA dizi analizinin başarılması, DNA probları ve PCR gibi nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin geliştirilmesi hızlı bir şekilde bir biri ardına ortaya konmuştur (15). PCR özellikle diğer moleküler yöntemlerden farklı olarak taşıdığı potansiyel nedeniyle daha yaygın kullanım alanı bularak hemen hemen her moleküler laboratuvara girmiştir.

Moleküler yöntemler, özellikle mikroskopi ile görülmesi, kültürde üretilmesi uzun zaman alan yada zor veya olanaksız olan mikroorganizmaların saptanmasında önemli rol oynamaktadır. Bu yöntemlerin tanı amacıyla bir başka kullanım alanı, hastaneye gelmeden önce tedavi başlandığı için kültürde üretilmeyen mikroorganizmaların saptanmasıdır.

Moleküler yöntemler oldukça hızlı olmaları ve tanımlama aralıklarının genişliği nedeniyle mikobakteri infeksiyonlarının tanısında da yaygın kullanım alanı bulmuştur. Mikobakteri infeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin amacı, şu ana başlıklar altında toplanabilir:

1. Mikobakterilerin klinik örneklerde varlığının saptanması.
2. Klinik örneklerde bulunan veya kültürde üretilen bakterilerin tiplendirilmesi veya türlerinin saptanması.
3. Mikobakterilerin antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençli olup olmadıklarının araştırılması.
4. Moleküler epidemiyolojik araştırmalar ile mikobakteri infeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkartılması.

## **POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

PCR ilk defa Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanmıştır (14). Bu yöntemde çoğaltılması (replikasyon) istenen DNA örneği, replikasyon için gereken maddelerle birlikte bir tüpe konarak, üç değişik ısıda bir döngü (siklus) içerisinde tutulur. İlk basamak DNA'nın denatürasyonudur. 94-95 °C'ye ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır (denatürasyon). İkinci basamak bağlanmadır (yapışma = annealing). Ortama konmuş ve sadece çoğaltılmak istenen DNA bölgesine özgül iki primer, sıcaklığın (50-70°C' ye) düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA'nın özgül oldukları bölgelerine bağlanırlar. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır (sentez = extension). Ortama konmuş ve optimum sentez sıcaklığı 72-74 °C olan *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı (ya da ısıya dayanıklı başka polimerazlar) bu ısıda hedef DNA'ya yapışmış primerlerin 3' ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin sentezini yapar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçası çoğaltılarak iki katına çıkarılmış olur. Yeni sentezlenen DNA da bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve bu DNA parçaları geometrik olarak artar. Teoride özgül DNA parçası siklus sayısı (n) ve başlangıçtaki hedef sayısına (t) bağlı olarak yaklaşık  $tx2^n$  sayısına ulaşır. Hedef sayısı, enzim, dNTP, primer konsantrasyonu ve çoğaltılan bölgenin birikmesi gibi nedenlerle ürün miktarı formüldeki sayıya ulaşmaz. Fakat yinede milyonlarca kopyalık çok yüksek yoğunluğa ulaşan hedef DNA molekülünün PCR sonrası agaroz jel elektroforezi gibi bir yöntemle gösterilmesi oldukça kolaydır (15,26).

### **PCR Uygulamasında Karşılaşılan Sorunlar**

PCR'deki sorunların ana nedeni testin yüksek duyarlılığı; ideal şartlarda bir tek genomu (bakteri veya virüs,vb.) dahi tespit edebilmesine dayanmaktadır. Hassas çalışma metotları ile dahi PCR laboratuvarında karşılaşılan sorunlar aşılammıştır. Daha güvenilir, standart, uygulaması kolay, az emek ve maliyet gerektiren tekniklere rutin uygulamada büyük ihtiyaç vardır (15).

En sık karşılaşılan sorunlar aşağıda sıralanmıştır:

1. Yalancı pozitif ve negatiflik
2. Deneyimli personel ve hassas çalışma gerektirme
3. Uzun süre ve iş yoğunluğu

4. Özel laboratuvar alt yapısı ve ekipman gerektirme
5. Sonuçların deneyimli kişiler tarafından yorumlanması
6. Standardizasyon gerekliliği
7. Maliyet Bu sorunların çözümü veya en aza indirilebilmesi için örnek alımından PCR'nin son aşamasına kadar bir dizi uyarı ve önleme sıkı bir şekilde uyulmalıdır.

### **Örnek Alma, Taşıma ve İşleme**

PCR için vücut sıvı (serum, vb.) ve sekresyonları veya dokular gibi her türlü materyal örnek olabilir. Fakat hemoglobin ve heparin gibi inhibitörlerden mümkün olduğu kadar kaçınılmalıdır. PCR için en uygun örnekler; etkenin yoğun bulunduğu, elde edilmesi kolay, en az kompleks ve yeterli miktarda elde edilebilen örneklerdir. Örnek usulüne uygun olarak alındıktan sonra; uygun örnek kabına (mümkünse RNase ve DNase bulunmayan) konularak taşınmalı ve saklanmalıdır. Bazı örneklerle gerekirse dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemleri uygulanabilir (15).

### **Nükleik Asitlerin İzolasyonu**

Bir örneğin PCR işleminde kullanılabilmesi için DNA veya RNA'nın izole edilmesi yani diğer maddelerden ayrılarak saflaştırılması (pürifikasyon) gerekir. Bu işlemde izole edilecek hedefe (DNA veya RNA) uygun metot kullanılmalıdır. Hedef RNA ise RNase inhibitörü ve RNase bulunmayan su, tamponlar ve sarf malzemeleri kullanılmalıdır. Bu aşamada örnekten (idrara, balgam ve hemoglobin, vb.) veya metottan kaynaklanan inhibitörler (fenol, SDS) elimine edilmelidir. Basit, etkili, hızlı ve güvenilir metotlar tercih edilmelidir. Yüksek ısı (kaynatma metodu) veya pH (alkali lizis metodu) özgülüğü ve DNA kalitesini azaltabilir. Kullanılan malzemeler (pipet, nükleaz bulunmayan tüp ve filtreli uç) kaliteli olmalıdır. Primer, prob ve nükleotitler mümkünse HPLC ile pürifiye edilmiş olmalıdır. Kaliteli enzimler (taq polimeraz) mümkünse oda ısısında inaktif olan ve ısıtıldığında aktifleşen modifiye taq polimerazlar kullanılmalıdır (15).

## **Alet ve Alt Yapı**

PCR uygulaması yapılacak alan mümkünse fiziksel olarak birbirinden ayrılmış dört odaya ayrılmalıdır. 1. Reajant hazırlama odası 2. Ekstraksiyon odası 3. Nestet PCR yapılacaksa ikinci PCR'nin pipetajının yapılacağı oda ve 4. Kirli oda (agaroz jel elektroforezinin yapılacağı oda). Eğer imkanlar yetersiz ise 3 oda da yeterli olabilir. "Termal Cycler"; hızlı, kapaktan ısıtılmalı olmalı, elektrik kesildiğinde kaldığı sıklardan başlayabilmeli, 0.2 ml ve 0.5 ml'lik blokları değişebilen aletler tercih edilmelidir. Reaktifler, diğer tampon sıvıları ve PCR karışımı mümkünse klas I laminar kabinde hazırlanmalıdır. Örneklerden DNA izole edilirken klas II laminar kabin tercih edilir. Kabin yoksa hava sirkülasyonu olmayan sadece bir yüzü açık camekanlı bölmeler kullanılabilir.

## **Görüntüleme Aşamasında Karşılaşılan Sorunlar**

Agaroz jelde bant görülmemesi; etidyum bromid katılmamasına, UV lambasının zayıflığına veya spesifik ürünün yokluğuna bağlı olabilir. Bu nedenle her PCR uygulamasında sistemin çalıştığının gösterilmesi için mutlaka pozitif kontrol bulunmalıdır. Bantlar bozuk ise ürün fazlalığı olabilir, agaroz jel iyi dökülmemiştir veya elektrik şiddeti fazla uygulanmıştır. Bantlar zayıf görülüyor ise; ürün veya etidyum bromid azdır, elektrik şiddeti fazladır. Fazla sayıda bant veya smear oluşumu varsa; PCR optimize değil, agaroz jel ve elektrik şiddeti uygun değildir.

## **RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)**

Restriksiyon enzimlerinin (RE) keşfi moleküler metotların gelişimini daha da hızlandırmıştır. RE'leri çift zincirli DNA dizisini belli nükleotit dizelerinden (ör. ATGC gibi) tanıyan ve kesen enzimlerdir. RE'leri bakterilerin kendilerini yabancı DNA'lardan korumasını sağlayan enzimlerdir. 1978 yılında RE'lerini ilk tanımlayan Aber W, Smith H ve Nathans D Nobel ödülü kazanmışlardır. Günümüzde yaklaşık 1200 RE tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Sınıflandırmada ilk üç harf enzimin kaynağı olan bakteriyi ve rakamda tanımlandıkça 1, 2 ve 3 gibi numarayı ifade eder. Örneğin PvuI enzimi *Proteus vulgaris*'ten elde edilen ilk RE'ni ifade eder. RE'lerinin DNA analizinde

kullanılması ile ayırım gücü oldukça yüksek bir teknik olan RFLP yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin temeli tüm kromozomal DNA veya PCR sonrası elde edilen DNA'nın RE'leri ile kesilerek DNA parçalarının agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra etidyum bromid ile boyanarak değerlendirilmesine dayanır. Bu yöntem oldukça özgüdür ve komple DNA analizlerine alternatif olabilir (15). Genomik DNA'nın RE'leri ile kesilmesinde oldukça uzun ve değerlendirmesi zor olan bu yöntem PCR sonrası uygulamalarda nispeten daha kolay ve kısa sürede uygulanabilir (6). Bu yöntemin avantajı çok az DNA ile çalışılması, kısa sürede sonuç vermesi ve radyoaktif madde kullanılmamasıdır. Yöntemin dezavantajları ise genomda ortaya çıkan doğal mutasyonların kesim bölgelerinin değiştirebilmesi ve bazen kısmi kesimlerin olmasıdır. RE'leri genellikle 10 ünite/ml konsantrasyonunda ve % 50 gliserollü tamponda – 20 °C'de tutulur. Enzimler oldukça pahalı olduğu için steril ortamlarda çalışılmalı ve enzimler buz üzerinde tutulmalıdır. Her enzimin optimum tamponu üretici firma tarafından enzimle birlikte verilmektedir. PCR ürünü, enzim ve tamponu uygun konsantrasyonda karıştırıldıktan sonra enzime uygun sıcaklıkta belirli bir süre (enzime göre değişir) tutulmalıdır. Sonra ise kesilen ürün agaroz jelde yürütülebilir. Günümüzde RFLP tekniği insan genetik çalışmaları (allelere ayırımı vb.) başta olmak üzere birçok genetik çalışmada kullanılmakta ve her geçen gün yeni RE'leri keşfedilmektedir (15).

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na tüberküloz şüphesi ile gönderilen dekontaminasyon-homojenizasyon işleminden geçirilen muayene maddeleri BACTEC 12 B (Middlebrook 7H12) besiyerine ekildi, üreme indeksi (Growth Index =GI)  $\geq 50$  oluncaya kadar başkaca bir işlem yapılmadan inkübe edilmeye devam edildi. *M.tuberculosis* için GI her gün iki kat arttı. MOTT basilleri daha yüksek günlük artış (3-10 kat) gösterirler ve daha erken saptanırlar (27). MOTT basilleri içinde *M. kansasii* en yavaş üreyendir. MTK'in ortalama saptanma zamanı 7-12 gün, MOTT basillerinin ise MTK'den 2-3 gün öncedir. GI  $\geq 50$  olduğunda her 12B besiyerinden kanlı agara pasaj yapıldı, 37 °C'de 24 saat inkübe edildi ve kanlı besiyerinde başka bakteriler üremediyse üreme *Mycobacterium* cinsi olarak kabul edildi. Aynı zamanda Ehrlich-Ziehl-Neelsen yönteminde ışık mikroskobunda x1000 büyütmede incelemek üzere yayma preparat hazırlandı.

Hazırlanan preparatta aside dirençli bakteri ve Kord faktör varlığı araştırıldı. Preparatta görülen aside dirençli bakterilerin gelişigüzel, düzensiz bir araya gelmiş bakteri yığınları şeklinde değil de, kordonlar oluşturacak şekilde ve her bir kordonu oluşturan yüzlerce hatta binlerce basilin her birinin uzun ekseninin kordonun uzun eksenine paralel olması, böylelikle kordonun iç yapısının son derece düzenli gözükmesi durumunda, bir mikobakteri suşunun kord oluşturma özelliğine sahip olduğu anlaşıldı. Bu şekilde uzun kordonlar oluşturabilme özelliği MTK türlerinin hücre duvarında varolan trehaloz-6',6'-dimikolat maddesinin varlığına bağlanmıştır.

Bu sebeple kord oluşturma özelliği temel olarak MTK'e ait bir özellik olarak kabul edildi. Kord oluşturmayanlar ise MOTT olarak kabul edildi.

Tüm ürünlere NAP testi yapıldı. NAP'ı inhibe edenler MTK, inhibe etmeyenler ise MOTT olarak kabul edildi.

Kord faktör ve NAP testi ile MTK ve MOTT olarak kabul edilenlere tür identifikasyonu yapılmak üzere moleküler metot uygulandı.

Kord faktör ve NAP testi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji laboratuvarında çalışıldı.

### **BACTEC BESİYERİNE EKİM (27)**

1. BACTEC 12 B şişesinde diğer mikroorganizmaların üremesini önlemek için PANTA üremeyi hızlandırıcı bir madde (POES) içinde çözündürüldü. Her BACTEC 12B şişesine 0.1 ml (4Ü) eklendi.
2. Dekontaminasyon, homojenizasyon işleminden geçirilen materyaller BACTEC 12B şişelerine 0.5 ml (20 Ü) ekildi, şişelerin lastik tıpaları her ekimden sonra dezenfektanla ve ardından % 70 isopropil alkol ile silindi,  $37 \pm 1$  °C'de inkübe edildi.
3. BACTEC 12B besiyeri kullanıldığında bir Löweinstein-Jensen besiyeri kullanılırsa mikobakterinin üremesine % 2-3 katkıda bulunduğundan bir adet Löweinstein-Jensen besiyerine de 0.1-0.25 ml ekim yapıldı.
4. Bütün işlemler emniyet kabiniinde yapıldı (Sınıf 2, HSM 1200)

### **Kültürlerin Okuma Programı (27)**

1. Ekim yapılan BACTEC 12B şişeleri ilk üç hafta, haftada 2 kez (Pazartesi-Perşembe), son üç hafta haftada 1 kez okutuldu (daha sık test etmek saptama zamanını kısaltır).
2.  $GI \geq 10$  olan bir şişe pozitif kabul edildi ve her gün test edildi.
3. Löweinstein-Jensen besiyerleri 6-8 hafta süreyle haftada bir kez kontrol edildi.

## Pozitif BACTEC 12B Şişesinden EZN Yayma (27)

1. Kültür pozitifse ( $GI \geq 10$ ) ise günlük okuma yapıldı.  $GI \geq 50$  olunca EZN yayma yapılmak üzere aşağıdaki şekilde hazırlandı.
2. BACTEC 12B şişesindeki besiyeri proteinden fakir olduğundan pozitif kültürlerden yayma yaparken yapışması için lama fiksasyon solusyonundan bir damla konuldu.

### Yayma Fiksasyon Solüsyonu:

Thiomerosal (Sigma)	0.02 gr (1:5000)
Distile su	80 ml
Fenol	0.5 ml (% 5)

lyice çözüldü ve % 20 tavşan serumu (veya diğer hayvan serumları) eklendi. Koyu renkli şişede, oda ısısında bir kaç ay kullanılabilir.

3. Pozitif BACTEC 12B şişesinden enjektörle 1-2 damla fiksasyon solusyonu üzerine eklendi.
4. Havada kurutuldu. Bir kaç kez alevden geçirerek veya 65-75 °C'de elektrikli ısıtıcı üzerinde 2 saat bekletilerek yayma fikse edildi.
5. Üstü karbol fuksin (fenollü fuksin, bazik fuksin) ile kaplandı. Lamlar, buhar çıkana kadar ama kaynamayacak şekilde 4-5 dakika ısıtılıp, yıkandı ve asit- alkol karışımı (3 ml HCL + 97 ml etil alkol - %95'lik) ile 2 dakika dekolorizasyon işlemine tabi tutuldu. Tekrar su ile yıkandıktan sonra zıt bir boyada (Löfflerin metilen mavisini) 1-2 dakika tutuldu. Yıkandı ve havada kurutuldu.
6. Boyanmış yaymanın üzerine bir damla immersiyon yağı konularak mikroskopta incelendi.
7. MTK yılanvari şeritler oluşturdu (kord faktör). Diğer mikobakteriler gevşek, dağınık kümeler halinde görüldü.

## BACTEC NAP TESTİ İLE İDENTİFİKASYON (27)

1. NAP *M. tuberculosis* kompleksini inhibe eder. MOTT ise inhibe olmaz.
2. NAP test şişesi içinde 5 mcg/ml NAP içeren bir disk vardır. Bu şişe ısıya ve neme maruz bırakılmamalı ve buzdolabında (2-8 °C) saklanmalıdır.



3. Bütün işlemler emniyet kabiniinde yapıldı.
4. BACTEC 12B şişesinde GI:50-100 olunca kanlı besiyerine ekilerek, kontaminasyon olmadığı gösterildi. Bu şişeden 1 ml alınıp NAP şişesine aktarıldı, ana şişe kontrol olarak kullanıldı.
5. GI:100'den büyükse ana BACTEC 12B şişesinden, aşağıda belirtilen oranlarda taze BACTEC 12B şişesine aktarıldı, iyice çalkalandı. Buradan 1 ml alındı NAP şişesine aktarıldı. Sulandırımın yapıldığı taze BACTEC 12B şişesi kontrol olarak kullanıldı.

GI: 50-100                      difüzyon gerekmez

GI: 101-201                    0.8 ml

GI: 201-400                    0.6 ml

GI: 401-600                    0.4 ml

GI: 601-800                    0.3 ml

GI: 801-999                    0.2 ml

GI: 999 ve üstü                0.1 ml

6. Kontrol ve NAP şişeleri  $37 \pm 1$  °C'de inkübe edildi.
7. NAP ve kontrol şişesinin günlük GI'ları 2-6 gün boyunca her gün test edilerek kaydedildi.
8. Kontrol şişesinin günlük GI değerinin artması gerekir.
9. NAP şişesinde ekimden sonra GI'da arka arkaya iki belirgin azalma veya ilk iki gün az fakat belirgin olmayan artış ve sonra azalma olması MTK olarak kabul edildi.
10. NAP şişesinde dört gün içinde 400 üzerinde günlük GI artışı veya ilk 1-3 günde hafif azalma veya hiç artış olmaması ve sonra birbirini takip eden iki günlük belirgin artış olması MOTT olarak kabul edildi.
11. NAP testinin tamamlanması için ortalama süre 4 gündür.

### **PCR ve RFLP YÖNTEMLERİ İLE MYCOBACTERIUM TÜRLERİNİN IDENTİFİKASYONU**

PCR ve RFLP metodu Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Klinik Mikrobiyoloji ve Anabilim Dalı laboratuvarında çalışıldı.

## Gereken Maddeler

EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit),	Sigma
Trizma Base,	”
Borik asit	”
Chelex-100	”
Standard agaroz	”
NuSieve GTG agaroz	FMC BioProduct
Ethidium bromid	Sigma
Taq polimeraz (5 ü/ul)	Promega, Roche veya Fermentas
dNTP	” ” ”
Primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'	50 nmol TIB MOLBIOL
Primer TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'	“ ”
Primer T4: 5'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG -3'	“ ”
Primer T5: 5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG -3'	“ ”
Enjeksiyonluk distile su	Eczacıbaşı ilaç
Muhtelif Filtreli pipet uçları:	1-10, 10-100, 50-200 ve 100-1000 µl hacimlerinde
Muhtelif Eppendorf tüpleri:	0.2 (ince cidarlı), 0.5 (thermal cycler'da kullanılacaksa ince cidarlı) ve 1.5 ml (yazı yazmak için yan yüzleri pürüzlü) hacimlerinde.

## PCR'da kullanılan Kitler

### 1. 10x PCR Buffer II

Contains no MgCl<sub>2</sub>

1,5 ml Roche

Lot: DO2634

Applied Biosystems

### 2. MgCl<sub>2</sub> Solution

25mM, 1,5 ml Roche

Lot: DO3123

Applied Biosystems

### 3. Ampli Taq Gold

250 Units 5u/µl Roche

Lot: DO3993

Applied Biosystems

4. Primerler ; marka adı: TIB MOBIOL  
**TB11;** Production Description no. 377960  
TIB reference no: 002120977  
5' – ACC ACC gAT ggt gTg TCC AT  
**TB12;** Production Description no. 377961  
TIB reference no: 002120977  
5' – CCT gTC gAA CCg CAT ACC CT

**RFLP'de kullanılan kitler ; marka adı: MBI Fermentas**

**1. BstEII (Eco 91I)**

#ER0391

10 units/µl, 1000 units

Lot.2721

Kaynağı; Escherichia coli RFL 91

5'... G↓G T N A C C...3'

3'... C C A N T G↑G...5'

**Buffer O<sup>+</sup>**

#B05

with BSA

Lot.4810

10x 1 ml

**2. HaeIII (BsuRI)**

#ER0151

10 units/µl, 3000 units

Lot.1222

Kaynağı; Bacillus subtilis R

5'... G G↓C C...3'

3'... C C↑G G...5'

**Buffer R<sup>+</sup>**

#BR5

with BSA

Lot. 4110

10x 1 ml

## Gereken Aletler

Su banyosu veya kuru ısıtıcı blok,	Nüve
Vorteks,	Techne
Derin dondurucu (-20 °C)	Nuarie
Buzdolabı 2 adet (temiz ve kirli odada)	-20 °C'lik bölmesi olan
Laminar hava akımlı kabin	CB 1204, dan LAF
Mikrosantrifüj (en az 14.000 devir, soğutmalı )	Jouan
Thermal cyler	Sanyo DNA Amplifies MIR – D40
Agaroz Jel Elektroforez Sistemi (Komple set)	
pH metre	
UV transilliminatör	
Mikrodalga fırın veya küçük elektrik ısıtıcısı	Arçelik
Mikropipetler (1-10, 10-100, 50-200, 100-1000 µl)	Rainin, Biohit, Costar

## Çalışma Üç Aşamada Yapıldı:

1. *Mycobacterium* DNA'sının izole edilmesi.
2. *Mycobacterium* DNA'sının saptanması.
  - a. Tüm *Mycobacterium*'lara Spesifik 65 Kilo Daltonluk Isı S ok Proteini Bölgesine ait PCR : Tüberküloz basilleri kompleksi dışındaki mikobakteriler de tiplendirilebilir.
  - b. Agaroz jel elektroforezi
3. Tüm *Mycobacterium*'lara Özgül 65 Kilo Daltonluk Isı S ok Proteini Bölgesine Ait PCR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesilerek *mycobacterium* türlerinin identifikasyonu.

### 1. *Mycobacterium* DNA'sının İzole Edilmesi:

Nükleik asitlerin hücrelerden ayrılarak, fiziksel ve/veya kimyasal işlemlerden geçirilip saflaştırılma işlemi ekstraksiyon (izolasyon) olarak tanımlanmaktadır. Bu işlem esnasında nükleik asitlerin parçalanmaya karşı korunması, amplifikasyon inhibitörlerinin ortamdaki uzaklaştırılması ve hedef nükleik asidin saflaştırılarak konsantre edilmesi amaçlandı. Bu çalışmada Löwenstein-Jensen besiyerinde taze

üremiş bir öze dolusu koloni alınıp distile suda süspansiyon yapıldıktan ve vortekslelendikten sonra ürünler 80-84 °C 'de 1 saat 15 dk. ısı bloğunda bekletildi ve nükleospin yöntemi uygulanarak DNA izolasyonu yapıldı(15,28,29).

## 2. **Mycobacterium DNA'sının Saptanması.**

### a. **Tüm Mycobacterium'lara Spesifik 65 Kilo Daltonluk Isı Şok Proteini Bölgesine ait PCR (6,15).**

DNA'nın çoğaltılabilmesi için PCR tepkime karışımında gerekli olan elemanlar şunlardır:

**DNA Ekstraktı:** Ekstraksiyonu yapılmış, amplifikasyona hazır hale getirilmiş DNA örneği.

**Primer'ler:** Çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan sınırlayan, çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan bir çift sentetik DNA parçalarıdır. Primerler 15-30 nükleotid uzunluğunda olup, mikroorganizma genomunun spesifik bölgesine yapışmaya uygun olarak hazırlandı. Primerler liyofilize halde geldiğinde DNAz ve RNAz free distile suda 10 pmol/ul olacak şekilde sulandırıldı. Daha sonra küçük hacimlere (10-20 örneklik) bölünerek –20 °C'de saklandı (21). Tüm mikobakterilerin PCR ile saptanması için primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3' ve TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3' kullanıldı (6,15).

**dNTP Karışımı:** Amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanmasında kullanılacak olan deoksi nükleotit trifosfatlar (dNTP'ler: eşit oranda dATP, dGTP, dCTP, dTTP)'lardan oluşur (21). Stok dNTP'ler 100 mM konsantrasyonda olup 10 defa DNAz ve RNAz free distile suda sulandırılarak küçük hacimlere (25-50 örneklik) bölünerek –20 °C'de saklandı. Sulandırılan bu solüsyondan 50 ul PCR karışımı için 1 ul dNTP eklendi.

**DNA Polimeraz:** *Thermus aquaticus* (Taq) bakterilerinden elde edilen termostabil Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. Optimal sıcaklıkta (70-80 °C) saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyonu ve 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini

gerçekleştirme özelliğine sahipti. Taq polimeraz genellikle 5 ünite/ul konsantrasyonda ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

**Tamponlar ve  $\text{MgCl}_2$ :** 10x PCR tamponunda 100 mM Tris ve 500 mM KCl bulunmaktadır. Taq DNA polimeraz  $\text{MgCl}_2$  varlığında etkindir.  $\text{MgCl}_2$ 'ün PCR'ın özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum  $\text{MgCl}_2$  konsantrasyonu olarak 1.5 mM tercih edildi. Çünkü düşük  $\text{Mg}^{+2}$  iyon konsantrasyonu zayıf ürün oluşumuna, yüksek  $\text{Mg}^{+2}$  iyon konsantrasyonu ise özgül olmayan ürün oluşumuna sebep olmaktadır (22,25). PCR buffer 10X ve  $\text{MgCl}_2$  (25 mM) Taq enzimi ile birlikte aşağıda belirtilen konsantrasyonda kullanıldı.

#### PCR Karışımının Hazırlanması:

Kırık buz üzerinde 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde aşağıdaki karışım hazırlandı:

Distile su	34.75	$\mu\text{l}$
PCR Bufer (10x konsantrasyonda)	5.0	,,
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	3.0	,,
dNTP (10 mM)	1.0	,,
Primer 1 (TB11, 10 pmol/ul)	0.5	,,
Primer 2 (TB12, 10 pmol/ul)	0.5	,,
Taq polimeraz (Promega, Roche veya Fementas 5 Ü/ul)	0.25	,,
<u>Örnek DNA</u>	<u>5</u>	<u>,,</u>
Toplam	50	,,

Yukarıdaki karışım vortekslenerek karıştırıldıktan sonra santrifüje edildi. Çalışılacak örnek sayısının çarpımı kadar hazırlanan karışım 45'er  $\mu\text{l}$  olarak örnek numaraları yazılmış 0.2 ml'lik eppendorf tüplerine dağıtıldı. Üzerine 5  $\mu\text{l}$  Mycobacterium DNA'sı eklenerek thermal cycler aletine yerleştirildi. "Thermal cycler" aletinde aşağıdaki siklus programı uygulandı

### Tüm Mycobacterium'lara Spesifik PCR Programı:

95	°C'de	10	dk.	1 siklus
95	„	1	„	} 35 siklus
55	„	1	„	
72	„	2	„	
72	„	8	„	1 siklus

### b-) Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jelde DNA bantlarının görülebilmesi için PCR ürünleri floresans bir boyayla (Etidyum bromid) muamele edildi. Ethidium bromid'le boyanan DNA bantları ultraviyole (Transilluminatör) ışığı altında görünür hale geldi. Beklenen PCR ürünlerinin varlığı DNA molekül ağırlık standartları (DNA marker) veya pozitif kontroldeki bant büyüklüğü ile karşılaştırılarak belirlendi (15,24).

Beklenen PCR ürünü büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonu Tablo 1'den belirlendi (15).

**Tablo 1. Agaroz Konsantrasyonu ile DNA Ayırma Gücü Arasındaki İlişki.**

Agaroz Konsantrasyonu (%)	DNA Ayırma Aralığı (baz çifti)
0.3	5000-60000
0.6	1000-20000
0.7	800-10000
0.8	500-7000
1.2	400-6000
1.5	200-3000
2.0	100-2000

### **PCR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi (15)**

1. 100 ile 2000 baz çifti arasındaki bir ürün için % 2.0'lik agaroz kullanıldı.
2. Agaroz ve terazinin bulunduğu odada elektroforez tankının büyüklüğüne göre dökülecek jel miktarı belirlendi. 120 ml'lik tank için; 2.4 gram agaroz tartılıp 120 ml 0.5 x TBE tamponuna ilave edildi.
3. 5x stok TBE buffer (54 gr Tris base, 27.5 gr Boric acid, 20 ml 0.5 M EDTA pH:8.0, 1 litre distile suda eritildi) on defa distile suda sulandırıldı ve 0.5x TBE bufer kullanma solüsyonu hazırlandı.
4. 120 ml 0.5x TBE bufer behere konuldu. Üzerine tartılan agaroz eklenerek karıştırıldı.
5. Mikro dalga fırında 1 dk 400 Watta tutuldu. Karıştırıldıktan sonra soğuması için beklenirken agaroz jelin döküleceği plate hazırlandı. Örnek sayısına göre 8'li veya 12'li tarak yerleştirildi.
6. 50 °C civarına kadar soğuyan 120 ml'lik agarozla 12 µl ethidium bromide (5 mg/ml) eklendi karıştırıldıktan sonra jel döküldü.
7. Jel donduktan sonra (yaklaşık 30 dakika oda ısısında) plate'nin iki tarafındaki lastikler ve tarak çıkarıldı.
8. Her örnek için parafilm üzerine 2 µl yükleme solüsyonu (10x Loding bufer: 500 mg Bromophenol blue, 5 ml gliserol, 5 ml distile su) kondu. 8'er µl PCR ürünü 2 µl yükleme solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra sırayla agaroz jele yüklendi.
9. 80 voltta 55 dakika elektroforez uygulandı.
10. Elektroforez durdurulduktan sonra jel UV transilliminatorde incelendi. Beklenen bant görülen örnekler pozitif kabul edildi. Poloroid fotoğraf makinası ile jeller fotoğraflandı.

### **3. Tüm Mycobacterium'lara Özgül 65 Kilo Daltonluk Isı Şok Proteini Bölgesine ait PCR Ürününün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Mycobacterium türlerinin İdentifikasyonu (6,15)**

Uygun (beklenen yerde ve yeterli yoğunlukta) bant görülen örneklerin 11'er µl'si *HaeIII* (*BsuRI*) ve *BstEII* (*Eco911*) enzimleri ile kesilerek Mycobacterium türleri identifiye edildi.



**HaellI ile PCR ürününün kesilmesi:**

Distile su	1.5	µl
Buffer R <sup>+</sup>	3.0	„
HaellI (10 ünite/ul, Fermentas)	1.5	„
<u>PCR ürünü</u>	<u>14.0</u>	<u>„</u>
Toplam	20.0	„

**BstEII ile PCR ürününün kesilmesi:**

Distile su	1.5	µl
Buffer O <sup>+</sup>	3.0	„
BstEII (10 ünite/ul, Fermentas)	1.5	„
<u>PCR ürünü</u>	<u>14.0</u>	<u>„</u>
Toplam	20.0	„

Enzim ve buffer karışımları örnek sayısınınca temiz odada hazırlandıktan sonra 0.2 ml'lik eppendorf tüplerine 6'ar µl olarak bölündü. Daha sonra kirli odada üzerlerine 14'er ul PCR ürünü eklendi ve 37 °C'de 24 saat etüvde bekletildi.

11. Daha sonra *Mycobacterium* türlerinin identifikasyonu için restriksiyon enzimleri ile kesilen ve kesilmeyen ürünler birlikte % 3'lük NuSieve GTG agaroz (FMC BioProduct)'da yürütüldü. PCR ürününün kesilmesi ile ortaya çıkan bantlar değerlendirilerek Poloroid fotoğraf makinası ile jeller fotoğraflandı (25,33). *Mycobacterium* türleri isimlendirildi (6,15).

12. İsimlendirilme <http://www.hospvd.ch:8005> internet adresinde ve Tablo 2'de gösterildiği gibi yapıldı.

**Tablo 2. PCR-RFLP ile Mikobakterilerin İdentifikasyon Tablosu**

<b>BstEII</b>	<b>HaEIII</b>	<b>Türlerin Adı</b>
<b>440</b>	170-130-0	<i>M. trivale</i> type 1
	160-85-55	<i>M. flavescens</i> type 3
	145-130-0	<i>M. lentiflavum</i> type 1
	140-100-90	<i>M. new</i> type 1
	140-55-50	<i>M. flavescens</i> type 1
	130-115-70-55	<i>M. aurum</i> type 2
	130-110-0	<i>M. new</i>
	130-105-70	<i>M. szulgai</i> type 1
<b>325-130</b>	200-60-55	<i>M. chelonae</i> type 1
	160-110-0	<i>M. haemophilium</i> type 1
<b>325-120</b>	185-140-0	<i>M. terrae</i> type 1
	170-140-0	<i>M. neoaurum</i> type 1
	145-130-50	<i>M. simiae</i> type 4
	140-85-55	<i>M. chitae</i> type 1
	140-60-55	<i>M. nonchromogenicum</i> type 2
	130-115-60	<i>M. gordonae</i> type 4
	130-110-70-55	<i>M. gordonae</i> type 8
	130-105-0	<i>M. genavense</i> type 1
130-95-75-60	<i>M. kansasii</i> type 5	
<b>240-210</b>	200-70-60	<i>M. abscessus</i> type 2
	180-135-70-50	<i>M. thermoresistibile</i> type 1
	180-130-0	<i>M. simiae</i> type 1
	180-100-50	<i>M. new</i> type 1
	145-140-100-55	<i>M. peregrinum</i> type 1
	145-130-95	<i>M. scrofulaceum</i> type 1
	145-130-0	<i>M. intracellulare</i> type 3
	145-105-80	<i>M. marinum</i> type 1
	145-105-60	<i>M. new</i> type 1
	145-70-60-50	<i>M. abscessus</i> type 1
	140-120-100-60	<i>M. peregrinum</i> type 2
	140-105-80	<i>M. intracellulare</i> type 2
	140-80-60-50	<i>M. phlei</i> type 1
	130-115-0	<i>M. gordonae</i> type 5
130-105-80	<i>M. kansasii</i> type 1	

<b>BstEII</b>	<b>HaEII</b>	<b>Türlerin Adı</b>
	130-105-60	M. avium type 1
	130-105-0	M. avium type 2
	130-80-60	M. celatum type 1
	125-110-0	M. interjectum type 1
<b>240-210</b>	120-115-110	M. intracellulare type 4
	110-105-0	M. asiaticum type 1

<b>240-135-80</b>	140-105-70	M. shimoidei type 1
-------------------	------------	---------------------

	160-85-55	M. species type 1
	145-140-100-60	M. peregrinum type 3
	145-125-60	M. smegmatis type 1
	130-105-80	M. celatum type 2
<b>240-130-85</b>	130-105-70	M. gastri type 1
	130-105-0	M. kansasii type 2
	130-100-75	M. kansasii type 6
	130-90-70	M. kansasii type 3
	130-95	M. lentiflavum type 4

	165-115-0	M. gordonae type 9
	160-110-60	M. gordonae type 7
	145-130-60	M. intracellulare type 1
<b>240-120-100</b>	145-130-0	M. lentiflavum type 3
	140-105-80	M. malmoense type 1
	140-60-0	M. hiberniae type 1
	130-110-0	M. gordonae type 3
	130-95-60	M. intracellulare type 4

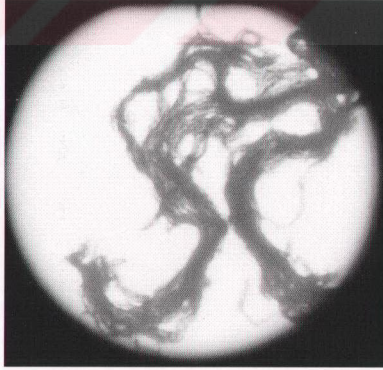
	220-110-0	M. gordonae type 2
	185-140-50	M. senegalense type 1
	160-115-60	M. gordonae type 1
	160-105-60	M. xenopi type 1
<b>240-120-85</b>	150-130-70	M. tuberculosis complex
	150-60-55	M. nonchromogenicum type 1
	145-120-55-50	M. fortuitum type 1
	140-125-55-50	M. farcinogenes type 1
	140-95-90	M. fortuitum type 2
	130-115-70-50	M. kansasii type 4

## BULGULAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na tüberküloz şüphesi ile gönderilen muayene maddelerinden üretilen ve *M. tuberculosis* kompleks ve MOTT olarak kabul edilen 24 adet mikobakteri kökeni çalışmaya alındı.

Bu kökenlerin ilk aşamada Kord faktör oluşturup oluşturmadıkları incelendi ve 24 örneğin 10'unda Kord faktör pozitif (+) bulundu ve bunlar *M. tuberculosis* kompleks olarak kabul edildi. Kord faktör negatif (-) olan 14 köken ise MOTT olarak kabul edildi.

Resim 1'de kord faktör oluşturan MTK kökeninin fotoğrafı görülmektedir.

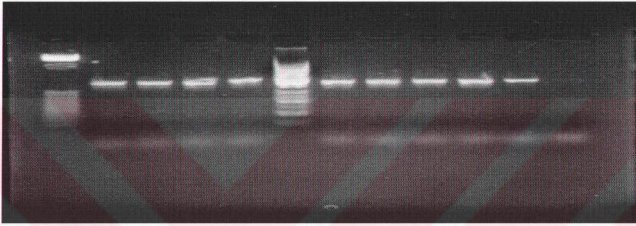


**Resim 1. Kord oluşumu**

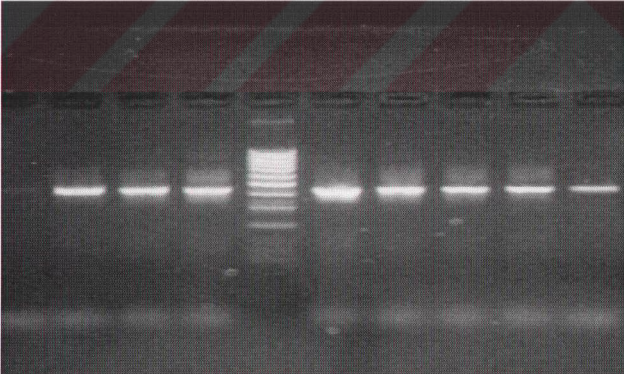
İkinci aşamada bu kökenlere NAP testi uygulandı. NAP'ı inhibe eden 10 köken *M. tuberculosis* kompleks, inhibe etmeyen 14 köken ise MOTT olarak kabul edildi.

Üçüncü aşamada ise bu kökenlere PRA metodu uygulandı. Tüm mikobakterilerin özgül 65 Kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait PCR ürünleri, restriksiyon enzimleri ile kesilerek tür identifikasyonu yapıldı.

Resim 2 ve Resim 3'de PCR sonrası agaroz jelde yürütülen bazı ürünlerin fotoğrafları görülmektedir.



Resim 2. PCR sonrası ürünlerin görüntüleri



Marker

Resim 3. PCR sonrası ürünlerin görüntüleri.

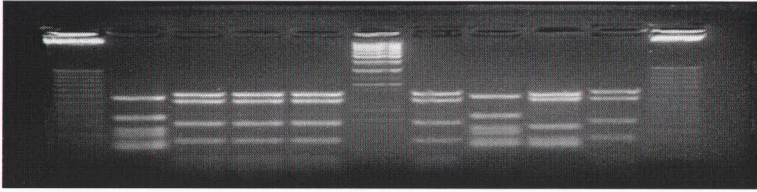
Kord faktör ve NAP testi ile *M. tuberculosis* kompleks olarak isimlendirilen 10 köken PRA metoduyla *M. tuberculosis* kompleks olarak kabul edildi. MOTT olarak kabul edilen 14 köken ise PRA metoduyla isimlendirildi. Bu kökenler:

- 3 köken *Mycobacterium intracellulare* tip I
- 2 köken *Mycobacterium phlei*
- 2 köken *Mycobacterium kansasii*
- 1 köken *Mycobacterium fortuitum* tip I
- 1 köken *Mycobacterium gordonae* tip I
- 1 köken *Mycobacterium abscessus* tip I
- 1 köken *Mycobacterium scrofulaceum*
- 1 köken *Mycobacterium szulgai* tip I
- 1 köken *Mycobacterium avium* tip II
- 1 köken *Mycobacterium terrae*

Tablo 3'de BstE II ve Hae III restriksiyon enzimleri ile kesilen 24 kökenin bant patern numaraları ve isimleri görülmektedir.

**Tablo 3. İsimlendirilmesi yapılan 24 köken.**

KÖKENLER	BstE II	Hae III	TÜRLER
1	240.210	140.80.60	<i>Mycobacterium phlei</i>
2	240.120.85	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
3	240.120.85	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
4	240.120.85	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
5	240.120.85	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
6	240.120.85	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
7	240.120.85	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
8	240.120.85	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
9	240.120.85	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
10	240.120.85	150.130.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
11	240.210	140.90.60	<i>Mycobacterium phlei</i>
12	240.120.100	145.130.60	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tip I
13	240.120.100	145.130.60	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tip I
14	325.130	185.140	<i>Mycobacterium terrae</i>
15	240.210	130.105.80	<i>Mycobacterium kansasii</i>
16	240.120.85	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
17	240.120.85	145.120.55	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip I
18	240.120.85	160.115.60	<i>Mycobacterium gordonae</i> tip I
19	240.120.100	145.130.60	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tip I
20	240.210	145.70.60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip I
21	440	130.105.70	<i>Mycobacterium szulgai</i> tip I
22	240.210	145.130.95	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
23	240.210	130.105.80	<i>Mycobacterium kansasii</i>
24	240.210	130.105.0	<i>Mycobacterium avium</i> tip II



Marker 1 2 3 4 Marker 5 11 12 16 Marker

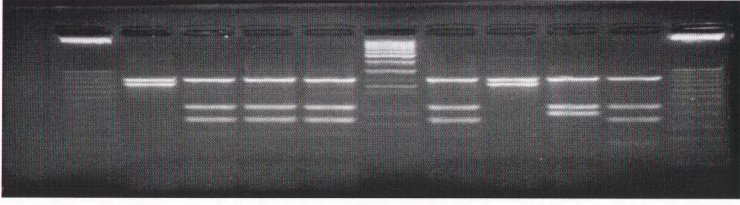
**Resim 4. Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün HaeIII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.**

İsmlendirilmesi yapılan 24 kökenin bant patern görüntüleri fotoğraflandı.

Resim 4'de 1,2,3,4,5,11,12,16 numaralı ürünlerin Hae III enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen bant patern görüntüleri ve Tablo 4'de ise bu ürünlerin bant numaraları ve isimleri görülmektedir.

**Tablo 4. İsmlendirilmesi yapılan ürünler ve bant numaraları.**

	Hae III	TÜRLER
1	140.80.60	<i>Mycobacterium phlei</i>
2	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
3	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
4	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
5	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
11	140.90.60	<i>Mycobacterium phlei</i>
12	145.130.60	<i>Mycobacterium intracellulare tip I</i>
16	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>



Marker 1 2 3 4 Marker 5 11 12 16 Marker

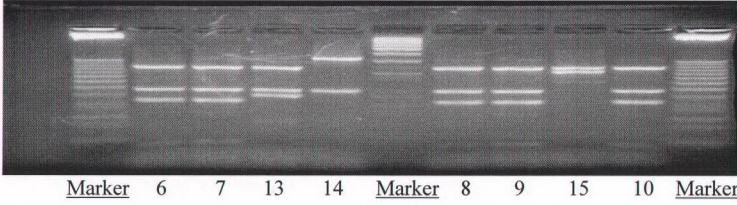
**Resim 5. Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün BstEII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.**

Resim 5'de 1,2,3,4,5,11,12,16 numaralı ürünlerin BstE II enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen bant patern görüntüleri ve Tablo 5'de ise bu ürünlerin bant numaraları ve isimleri görülmektedir.

**Tablo 5: İsimlendirilmesi yapılan ürünler ve bant numaraları.**

	<b>BstE II</b>	<b>TÜRLER</b>
1	240.210	<i>Mycobacterium phlei</i>
2	240.120.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
3	240.120.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
4	240.120.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
5	240.120.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
11	240.210	<i>Mycobacterium phlei</i>
12	240.120.100	<i>Mycobacterium intracellulare tip I</i>
16	240.120.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>



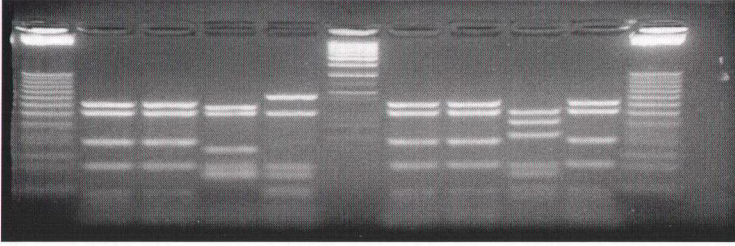


**Resim 6. Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün BstEII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.**

Resim 6'da 6,7,13,14,8,9,15,10 numaralı ürünlerin BstE II enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen bant patern görüntüleri ve Tablo 6'da ise bu ürünlerin bant numaraları ve isimleri görülmektedir.

**Tablo 6. İsimlendirilmesi yapılan ürünler ve bant numaraları**

	<b>BstE II</b>	<b>TÜRLER</b>
6	240.120.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
7	240.120.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
8	240.120.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
9	240.120.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
10	240.120.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
13	240.120.100	<i>Mycobacterium intracellulare tip I</i>
14	325.130	<i>Mycobacterium terrae</i>
15	240.210	<i>Mycobacterium kansasii</i>



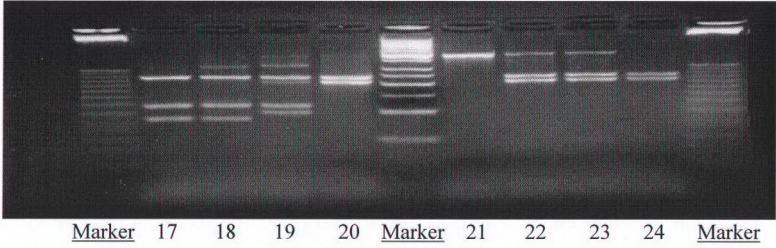
Marker 6 7 13 14 Marker 8 9 15 10 Marker

**Resim 7. Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün HaeIII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.**

Resim 7'de 6,7,13,14,8,9,15,10 numaralı ürünlerin Hae III enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen bant patern görüntüleri ve Tablo 7'de ise bu ürünlerin bant numaraları ve isimleri görülmektedir.

**Tablo 7. İsimlendirilmesi yapılan ürünler ve bant numaraları**

	<b>Hae III</b>	<b>TÜRLER</b>
6	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
7	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
8	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
9	150.130.70	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
10	150.130.85	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
13	145.130.60	<i>Mycobacterium intracellulare tip I</i>
14	185.140	<i>Mycobacterium terrae</i>
15	130.105.80	<i>Mycobacterium kansasii</i>



**Resim 8. Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün BstEII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.**

Resim 8'de 17,18,19,20,21,22,23,24 numaralı ürünlerin BstE II enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen bant patern görüntüleri ve Tablo 8'de ise bu ürünlerin bant numaraları ve isimleri görülmektedir.

**Tablo 8. İsimlendirilmesi yapılan ürünler ve bant numaraları**

BstE II	BstE II	TÜRLER
17	240.120.85	<i>Mycobacterium fortuitum tip I</i>
18	240.120.85	<i>Mycobacterium gordonae tip I</i>
19	240.120.100	<i>Mycobacterium intracellulare tip I</i>
20	240.210	<i>Mycobacterium abscessus tip I</i>
21	440	<i>Mycobacterium szulgai tip I</i>
22	240.210	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
23	240.210	<i>Mycobacterium kansasii</i>
24	240.210	<i>Mycobacterium avium tip II</i>



Marker 17 18 19 20 Marker 21 22 23 24 Marker

**Resim 9. Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün HaeIII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri**

Resim 9'da 17,18,19,20,21,22,23,24 numaralı ürünlerin Hae III enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen bant patern görüntüleri ve Tablo 9'da ise bu ürünlerin bant numaraları ve isimleri görülmektedir.

**Tablo 9. İsimlendirilmesi yapılan ürünler ve bant numaraları**

	<b>Hae III</b>	<b>TÜRLER</b>
17	145.120.55	<i>Mycobacterium fortuitum tip I</i>
18	160.115.60	<i>Mycobacterium gordonae tip I</i>
19	145.130.60	<i>Mycobacterium intracellulare tip I</i>
20	145.70.60	<i>Mycobacterium abscessus tip I</i>
21	130.105.70	<i>Mycobacterium szulgai tip I</i>
22	145.130.95	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
23	130.105.80	<i>Mycobacterium kansasii</i>
24	130.105.0	<i>Mycobacterium avium tip II</i>

## TARTIŞMA

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na tüberküloz şüphesi ile gönderilen muayene maddelerinden üretilen 24 adet mikobakteri kökeni çalışmaya alındı. Kord faktör ve NAP testi ile *M.tuberculosis* kompleks olarak isimlendirilen 10 köken moleküler metotla da *M.tuberculosis* kompleks olarak kabul edildi. MOTT olarak kabul edilen 14 köken ise kullandığımız moleküler metotla farklı mikobakteri türleri olarak tanımlandı.

Tüberkülozun dünyada süratle yayılması, dirençli tüberküloz suşlarının yüzdesinin giderek artması, hızlı laboratuvar tanısını kaçınılmaz hale getirmiştir. Günümüzde yeni vakaları en kısa sürede saptamanın, hastaların uygun tedavilerine bir an önce geçebilmek ve bulaştırıcı süreyi kısaltmak için çok önemli olduğu kabul edilmiştir.

Tenover ve ark.(31) tüberküloz laboratuvarlarının hızlı tanıyı sağlayabilecek şekilde yeniden düzenlenmesi gerektiğini 1993 yılından başlamak üzere vurgulamışlar, EZN yayma sonuçlarının 24 saat içinde bildirilmesini, *M tuberculosis* suşlarının üretilmesi ve identifikasyonun 10 –14 gün içinde tamamlanmasını, direnç deneyi sonuçlarının da 15-30 günler arasında verilmesini hedef olarak göstermişlerdir.

Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda Kord oluşturma ve BACTEC NAP deneyi 1990'lı yılların başlarına kadar altın standart olarak kabul edilirken, yakın zamanlarda bu özelliğini moleküler yöntemlere kaptırmıştır (1).

Bazı MOTT türleri nadiren kord oluştursalar da, kord oluşturma esas olarak, *M. tuberculosis* kompleks türlerine ait bir özelliktir (8,9,18-20). Kord oluşturma deneyi çok ucuz olması, ilk yatırım gerektirmemesi, var olan konvansiyonel tüberküloz

laboratuvarları teknisyenlerince kolayca uygulanabilecek olması, hızlı sonuç vermesi dolayısıyla ülkemiz koşulları için çok uygundur (11).

Köksalan'ın (1) çalışmasında 77 pozitif BACTEC kültüründen yapılan EZN yaymalarında kord faktörün duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla % 92.6, %100, %100 ve % 64.3 bulunmuştur. Negatif prediktif değer düşük olması nedeniyle ülkemizde kord faktör pozitif bulunan durumlarda *M.tuberculosis* complex üredi şeklinde ön tanı verilebileceği fakat kord faktörün negatif bulunduğu durumlarda ise sadece kord faktöre dayanarak bir ön tanı verilmemesi ve *hsp65* PRA gibi başka bir identifikasyon yönteminin eş zamanlı olarak kullanılması gerektiğini bildirilmiştir.

İzmir'de Badak ve ark. (32) 370 pozitif MB/BacT kültüründen, Kinyoun boyamasıyla kord oluşumunu değerlendirdiği çalışmada duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler birinci gözlemci tarafından sırasıyla % 88.2, % 97.4, %99.2, % 69.7, ikinci gözlemci tarafından; % 90.6, %52.3, %82.8, %69.7 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak *M. tuberculosis* complex üretme oranı yüksek laboratuvarlarda deneyimli mikrobiyologlar tarafından yaymalarda kord oluşumunun gözlenmesinin hızlı ve güvenilir olduğu vurgulanmıştır.

McCarter ve ark. (19) *M.tuberculosis*'in tanımlanması için çok hızlı bir metot olarak BACTEC 12B besiyerinde kord oluşumunu bulmuşlardır. Pozitif 666 BACTEC kültüründen Kinyoun boyamayla kord oluşumunun duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla % 89.2, % 99.2, %98.5, % 94.2 olduğunu ve BACTEC 12B içinde kord oluşumunun varlığının belirlenmesinin güvenilir ve *M.tuberculosis*'in hızlı bir şekilde belirlenmesi için kullanılabilirliğini bildirmişlerdir.

Yagupsky ve ark. (10) çalışmasında 270 pozitif BACTEC 7H12 kültüründen NAP ve biyokimyasal yöntemlerle tür identifikasyonu yapılmış olup, kinyoun yöntemiyle boyanan yaymalarda 3 gözlemci kord oluşumunu değerlendirmiştir. Her üç gözlemci arasında uyum % 93.3 olarak saptanmıştır.

Bu değerlere bakılarak ve en önemlisi de çok hızlı, kolay ve ucuz olması dolayısıyla kord oluşumu ön tanı deneyi olarak önerilebilir.

BACTEC NAP deneyi, *M.tuberculosis* kompleks kökenlerini MOTT suşlarından ayıran ancak MOTT kökenlerinin tür düzeyinde ayrımını vermeyen kısmi bir identifikasyon yöntemidir ve oldukça pahalı bir yöntemdir (her köken için yaklaşık olarak 22-25 USD). BACTEC sisteminin en önemli dezavantajlarından biri doğru ve

daha hızlı sonuç için mutlaka hafta sonu okumalarına ihtiyaç göstermesidir. Ayrıca testin sonuçlanması ortalama beş gün sürmektedir (1,6).

Biyokimyasal testler çok ucuz maliyetli olması, tür düzeyine kadar identifikasyon yapmasına rağmen çok fazla emek gerektirdiği için ülkemizde rutin tüberküloz laboratuvarlarında önerilmemektedir (15).

İlk kez 1993 yılının başlarında gündeme gelen *hsp 65* geninin PCR-RFLP analizi yönteminin özgüllüğü, hızlılığı, maliyet etkinliği ve verimliliğini ortaya çıkaran bir çok çalışma çeşitli yayınlarda da bildirilmiş ve rutin olarak uygulanmasını olanaklı kılmıştır (7,11,33,34).

Ayrıca *hsp65* geninin PCR-RFLP analizi diğerleri gibi özel cihazlar, hibridizasyon aşamaları gerektirmez, kolay, hızlı, ucuz olup tek deneyde, bir günde pek çok türün izolasyonunu sağlar. Sıvı besiyerinden izolasyonda kullanılabilir (6,7).

da Silva CF ve ark. (2) materyallerden izole ettikleri suşlarla yaptıkları çalışmanın sonucunda biyokimyasal identifikasyon ve PRA metodu arasında uyum olduğunu ancak PRA metodunda türlerin tanımlanması için gereken zamanın bir haftadan az olduğunu, tek bir kişi tarafından uygulanabileceğini, biyokimyasal yöntemlere göre de ekonomik olduğu için rutin uygulamada mikobakteri tanımlamasını yapabileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanında biyokimyasal yöntemlerin genellikle sterilizasyon, ortamın hazırlanması ve kültürlerin taşınması içinde farklı kişilere ihtiyaç gösterdiğini bildirmişlerdir.

da Silva Rocha ve ark. (3) PCR-RFLP yönteminin tanımlanamayan mikobakteriyal örneklerin araştırılması için yararlı olabileceğini ve çalıştıkları tüm mikobakteriyal izolatların ayrımı için ekonomik ve kolay bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Mikobakterilerin hızlı identifikasyonunda kullanılan ticari sistemlerin en önemli avantajları, hızlı, emniyetli ve güvenilir olmasının yanı sıra, kontaminasyon riskinin düşük buna bağlı olarak duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olmasıdır. Ayrıca bir çoğunun teknik olarak otomatize veya yarı otomatize olmaları, reaktif ve standartlarının kullanıma hazır olması laboratuvar kullanımlarını kolaylaştıran faktörler olarak önemlidir. En önemli dezavantajları ise pahalı olmaları, çoğunun henüz “ Food and Drug Administration “ FDA onayı almaması ve bir kısmında faz çalışmalarının tamamlanmamış olmasıdır. Bu nedenle sistemlere ait mevcut ticari ürünlerin tarama testi olarak kullanılmamaları, daha çok yayma pozitif klinik örneklerde kullanılmaları tercih edilmelidir (25).

Suffys ve ark. (35) INNO-LIPA testini kullanarak mikobakterilerin tür düzeyine kadar ayrımlarını yapmış ve bunları DNA dizi analizi ve PRA metodu ile karşılaştırmıştır. 16S-23S rRNA bölgesini hedef alan LIPA testinin güvenilirliğini % 99.4 olduğunu, LIPA testi ile hsp65 genini hedef alan PRA'nın tanımlamaları arasında bir ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir.

Mondragon-Barreto ve ark. (36) biyokimyasal testler, HPLC ve PCR-RFLP olmak üzere üç farklı yöntemi mikobakteri tanımlanmasında uygunluk, ekonomi ve algoritma bulunması açısından karşılaştırmışlardır. PCR-RFLP yönteminin en hızlı ve özgül olmasına karşın pahalı olduğunu, biyokimyasal testlerin *M.tuberculosis*'in tanımlanması için üstün bir yöntem ancak diğer türler için daha pahalı ve uzun süre gerektirdiğini, HPLC yönteminin ise maliyet, hız ve özgüllük olarak ortada yer aldığını söylemişlerdir. *M.tuberculosis*'in tanımlanması için öncelikle biyokimyasal testlerin uygulanmasını, sonuçlar MOTT gösteriyorsa izolatların HPLC ile analiz edilmesini, sonuçlar belirsiz ise PCR-RFLP yönteminin kullanılmasını daha önce belirlenmemiş PCR-RFLP paterni gösteren izolatların ise DNA dizi analizi yöntemiyle karakterize edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Ena P ve ark. (5) MOTT türlerinin oluşturduğu kutanöz infeksiyonların doğru ve hızlı tanımlanması için mikobakterilerin varlığının gösterilmesi gerektiğini, rutin uygulanabilir tekniklerin hassasiyetinin düşük ve çok yorucu olduğunu sıklıkla mikobakterilerin EZN boyamadan sonra görülmediğini, sıvı besiyerinde üreyen mikobakterilerin tanımlanması için PCR-PRA kullandıklarını ve tanımlama süresinin de konvansiyonel metotlara göre daha kısa olduğunu bildirmişlerdir.

de Magalhaes ve ark. (37) 247 muayene materyalinden ve 88 pozitif kültürden mikobakteri türlerinin tanımlanması için hsp65 RFLP yönteminin güvenilirliğini, konvansiyonel kültür ve biyokimyasal test sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. Bu yöntemin çok düşük büyüme indeksine sahip olan bakteriyel kültürlerde bile etkili olduğunu, tanı için zamanı kısalttığını ancak klinik örneklerde uygulandığında düşük özgüllük gösterdiğini bildirmişlerdir.

hsp65 geninin PCR-RFLP analizi EZN pozitif balgamdan DNA elde edilerek denenmiş ama restriksiyon enzimini inhibe eden maddelerin varlığı nedeniyle başarılı olamamıştır (20,38). Bu yöntemle *M tuberculosis* kompleksten, *M tuberculosis* ayırt edilemez. Bu durum grubun ileri düzeyde genetik ilişkisi nedeniyle ve bu sorun PCR'a dayalı diğer identifikasyon metotları için de geçerlidir (7).



Derek ve ark. (4) hsp 65 genin PCR-RFLP analizi yöntemiyle *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium avium* kompleks örnekleri için duyarlılık ve özgülüğünü % 100 olarak bildirmişlerdir. Test edilen izolatların sayısının az olmasına rağmen sonuçların cesaret verici, diğer testlerle karşılaştırıldığında da maliyetinin ekonomik olduğu (her bir örnek için 1.50 USD) ve rutin klinik laboratuvarlarda kullanımının oldukça uygun olduğunu bildirmişlerdir.

hsp 65 genin PCR-RFLP analizi yöntemi bir günde sonuçlanan ve mikobakterileri tür düzeyinde tanımlama için standard bir methodur, hibridizasyon, türe özgül prob, radyoaktivite gerektirmez (6,7,9,11,13,38).

hsp65 geninin PCR-RFLP analizinde kullanılan Tb11 ve Tb12 primerleri mikobakteriyel olmayan diğer bakterilerin de (*Nocardia braziliensis*, *Streptococcus albus*, *Rhodococcus equi* vb) 65 kDa ısı şok protein geninin bir bölümünü çoğaltabilir. Genellikle PCR-RFLP analizinden önce kültürün EZN boyaması yapıldığından ve oluşan restriksiyon paternleri karışmayacağından bu sorun yaratmayacaktır (6).

Kord oluşumu ve BACTEC NAP deneyi, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerini MOTT kökenlerinden ayıran, ancak MOTT kökenlerinin tür düzeyinde ayırımını vermeyen kısmi bir tanımlama yöntemidir. hsp65 genin PCR-RFLP analizi metodu ise MOTT kökenlerinin tür düzeyinde ayırımını veren bir tanımlama yöntemidir.

Kord oluşturma deneyinin doğrulanması gerektiğinde sonuç hsp 65 genin PCR-RFLP analizi yöntemiyle bir gün içinde verilebilmekte, toplam tanımlama maliyeti (kord oluşturma deneyi maliyeti + hsp 65 genin PCR-RFLP analizi maliyeti) sadece 1.6 (0.1 + 1.5) USD tutmaktadır (10,17). Bunun için halen rutin tanımlama yöntemi olarak kullanılan pahalı BACTEC NAP deneyi yerine, toplam maliyeti 1.6 USD olan kord oluşturma deneyi - hsp 65 geninin PCR-RFLP analizi yöntemlerinin rutin uygulamaya geçirilmesi önerilmektedir (1,4).

Bu çalışmada rutin uygulamada kullanılan kord oluşumu ve NAP deneyi ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve MOTT olarak değerlendirilen kökenler kullanılan PRA metoduyla da %100 uyumlu bulundu. Bu çalışmada yer alan kökenlerin PRA metodu kullanılarak bir günde tanımlanması ve oldukça ekonomik olduğunun diğer çalışmalarda gösterilmesi bu metodun kullanımını önermemizin önemli nedenidir.

## SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na tüberküloz şüphesi ile gönderilen muayene maddelerinden üretilen ve *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve MOTT olarak kabul edilen 24 adet mikobakteri kökeni çalışmaya alındı.

Bu kökenlerin ilk aşamada kord faktör oluşturup oluşturmadıkları incelendi ve 24 örneğin 10'unda Kord faktör pozitif (+) bulundu ve bunlar *Mycobacterium tuberculosis* kompleks olarak kabul edildi. Kord faktör negatif (-) olan 14 köken ise MOTT olarak kabul edildi.

İkinci aşamada bu kökenlere NAP testi uygulandı. NAP'ı inhibe eden 10 köken *M. tuberculosis* kompleks, inhibe etmeyen 14 köken ise MOTT olarak kabul edildi.

Üçüncü aşamada ise bu kökenlere moleküler metot uygulandı. Tüm mikobakterilere spesifik 65 Kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek mikobakteri türlerinin identifikasyonu yapıldı.

Kord faktör ve NAP testi ile MTK olarak isimlendirilen 10 köken moleküler metotlarda MTK olarak bulundu. MOTT olarak kabul edilen 14 köken ise kullandığımız moleküler metotla PCR ürünün kesilmesi ile ortaya çıkan bantların değerlendirilmesiyle mikobakteri türleri olarak identifiye edildi. Bunlar:

- 3 köken **Mycobacterium intracellulare** tip I
- 2 köken **Mycobacterium phlei**
- 2 köken ***Mycobacterium kansasii***
- 1 köken **Mycobacterium fortuitum** tip I
- 1 köken **Mycobacterium gordonae** tip I
- 1 köken **Mycobacterium abscessus** tip I
- 1 köken **Mycobacterium scrofulaceum**
- 1 köken **Mycobacterium szulgai** tip I
- 1 köken **Mycobacterium avium** tip II
- 1 köken **Mycobacterium terrae**

hsp65 Geninin PCR-RFLP analizi metodu çok hızlı (24 saat) olmasının yanında kısmi identifikasyon değil, tür düzeyinde tam identifikasyon yapabilen metot olduğundan rutinde kullanılacak bir metot olarak kabul edilebilir.

## ÖZET

Isı şok proteinleri, ısıdaki ani artış veya diğer çevresel strese karşı cevapta sentezlenen proteinlerdir. Bilinen tüm mikobakteri türlerinde olan 65 kDa ısı şok protein'in *hsp65* genindeki dizilim farkları hem yavaş hem de hızlı üreyen mikobakteri türlerinin saptanmasında kullanılabilir.

*hsp65* genin Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) analizi metodu bütün mikobakteriler için ortak olan primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününün restriksiyon enzim analizine dayanır. Bu metot sıvı besiyerinde üreyen kültürlerle uygulanabilmekte ve bir günde sonuçlanmaktadır, mikobakterileri tür düzeyinde tanımlama için standart bir yöntemdir, hibridizasyon, radyoaktivite gerektirmez.

Bu araştırmada Kord faktör ve NAP testi ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) ve Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT) tanısı konmuş mikobakterilerin PCR-RFLP analizi metodu kullanılarak doğrulanması ve aynı zamanda MOTT olarak kabul edilen türlerin tanımlanması amaçlanmıştır. NAP testiyle 3-5 günde sonuç alınırken, bu metotla 1 günde sonuç alınabilmektedir.

Kord faktör ve NAP testi ile MTK olarak isimlendirilen 10 köken PCR-RFLP metoduyla da MTK olarak kabul edildi. MOTT olarak kabul edilen 14 köken ise kullandığımız moleküler metotla PCR ürününün kesilmesi ile ortaya çıkan bantların değerlendirilmesiyle *Mycobacterium* türleri olarak tanımlanmıştır. Bunlar: 3 köken *M.intracellulare* tip I, 2 köken *M.phlei*, 2 köken *M.kansasii* ve 1'er köken de *M.fortuitum* tip I, *M.gordonae* tip I, *M.abscessus* tip I, *M.scrofulaceum*, *M.szulgai* tip I, *M.avium* tip II, *M.terrae* olarak bulundu.

PCR-RFLP; çok hızlı (24 saat), mikobakterilerin tür düzeyinde tam identifikasyonunu yapabildiğinden rutinde kullanılacak bir metot olarak kabul edilebilir.

Anahtar kelimeler: Mycobacteria, PCR-RFLP, hsp65.



## **IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA SPECIES BY MOLECULAR METHODS SUMMARY**

Heat shock proteins are the ones synthesized in response to sudden increase in temperature or other environmental stress factors. All the known mycobacteria have 65kDa heat shock protein. Sequence differences of hsp65 gene can be used to identify both rapidly or slowly growing mycobacteria.

Polimeraz Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the hsp65 gene method involves restriction enzyme analysis of PCR products obtained with primers common to all mycobacteria. This method is a standard procedure which can identify mycobacteria to the species level, can be performed within one working day, doesn't include hybridization steps or radioactivity but can be performed only with fluid culture media.

In this study, mycobacteria identified as *M.tuberculosis* complex (MTC) and Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT) before with cord factor and NAP test were reidentified with PCR-RFLP analysis method. MOTT were also identified to the species level. Although the NAP test resulted within 3-5 days, PCR-RFLP resulted in one day.

Ten species identified as MTC with NAP and cord factor were confirmed with PCR-RFLP. With the restriction of PCR product with PCR-RFLP, fourteen species identified as MOTT were also identified to the species level. These are as follows: Three species *M.intracellulare* type I, two species *M.phlei*, two species *M.kansasii* and one species *M.fortuitum* tip I, one species *M.gordonae* type I, one species

*M.abscessus* type I, one species *M.scrofulaceum*, one species *M.szulgai* type I, one species *M.avium* type, one species *M.terrae*.II.

PCR-RFLP is a very rapid method which provides exact identification of mycobacteria species so it can be performed in routine procedures.

Keywords: Mycobacteria, PCR-RFLP, hsp65.



## KAYNAKLAR

1. Köksalan K. Kord oluşturma, BACTEC NAP testi ve biyokimyasal identifikasyon yöntemlerinin karşılaştırılması ve İstanbul'da mikobakteri suşlarının türlere göre dağılımı.(tez) İstanbul:. İÜ Tıp Fakültesi 1999.
2. da Silva CF, Ueki SY, Geiger DCP, Leağ SC. hsp 65 PCR-Restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. Rev Inst Med Trop. 2001; 43 (1): 25-28.
3. da Silva Rocha A, da Costa Leite C, Torres HM, de Miranda AB, Pires Lopes MQ, Degrave WM "et al". Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil.J Microbiol Methods. 1999; 37: 223-29.
4. Derek AW, Peter CWY, Danny TL Cheung, and KAI MAN KAM. Simple and Rational Approach to the Identification of Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium Complex Species, and Other Commonly Isolated Mycobacteria.J Clin Microbiol. 2001; 39; 3768-71.
5. Ena P, Sechi LA, Saccabusi S, Moliccotti P, Lorrai MP, Siddi M "et.al". Rapid identification of cutaneous infections by nontubercular mycobacteria by polymerase chain reaction-restriction analysis length polymorphism of the hsp65 gene. Int Jour of Dermatology. 2001; 40: 495.
6. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Mycobacteria Growing in Liquid Media. J Clin Microbiol. 1997; 35:79-5.
7. TelentiA, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by PCR and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol.1993;31: 175-78.
8. Kaminski DA, Hardy DJ. Selective utilization of DNA probes for identification of Mycobacterium species on the basis of cord formation in primary BACTEC 12B cultures. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1548-50.
9. Morris AJ, Reler LB. Reliability of cord formation in BACTEC media for presumptive identification of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2533-34.



10. Yagupsky PV, Kaminski DA, Palmer KM, Nolte FS. Cord formation in BACTEC 7H12 medium for rapid, presumptive identification of *M.tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 1451-53.
11. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2969-73.
12. Shinnick TM. The 65-kilodalton antigen of *M.tuberculosis*. *J Bacteriol.* 1987; 169:1080-88.
13. Swanson DS, Pan X, Muser JM. Identification and subspecific differentiation of *M.scrofulaceum* by automated sequencing of a region of the gene (hsp65) encoding a 65-kilodalton heat shock protein. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 3151-59.
14. Kıyan M. *Mycobacteriaceae* Ustaçelebi Ş (Editör). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*.de Ankara. Güven Kitabevi. 1999; p.420-54.
15. Saniç A, Eroğlu C. *Tüberküloz tanısında PCR.21.yüzyılda tüberküloz sempozyumu. II.Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu.* Samsun: 2003: 310-23.
16. Pfyffer G, Brown-Elliott B.A, Wallace R.Jr. *Mycobacterium: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures.*In "Murray P.R, Baron E.J, Jorgensen J.H, Pfaller M.A, Tenover F.C, Tenover R.H (Eds). *Manuel of Clinical Microbiology.* 8<sup>th</sup> ed." , ASM Pres.Washington D.C.;2003: p.532-59.
17. Babacan F, Över U. *Mikobakterilerin genel özellikleri ve Mycobacterium tuberculosis complex.* de. Wilke T.A, Söyletir G, Doğanay M (Eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002: p.1675-90.
18. Beverly M, Diem L. Algorithm for use of nucleic acid probes identifying *Mycobacterium tuberculosis* from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 1934-37.
19. Mc Carter YS, Ratkiewicz IN, Robinson A. Cord information in BACTEC medium is a reliable, rapid method for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 2769-71.
20. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria:molecular versus phenotypic methods. *J Clin Mikrobiol.* 1996; 34: 296-03.
21. Rota S. *Tüberküloz Dışı Mikobakteriler ve Mycobacterium lepra.* In. Wilke T.A, Söyletir G, Doğanay M (Eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002: p. 1691-97.
22. Tonjum T, Welty DB, Jantzen E, Small PL. Differentiation of *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium marinum*, and *Mycobacterium goodii*:mapping of their relationship to *M.tuberculosis* by fatty acid profile analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:918-25.
23. Butler WR, Jost KC Jr, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 2468-72.
24. Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost KC, Wallace R Jr, *Mycobacterium: Phenotypic and Genotypic Identification.*In. "Murray PR, Baron E J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover F.C, Tenover R.H (Eds). *Manuel of Clinical Microbiology.* 8<sup>th</sup> ed." , ASM Pres.Washington D.C.;2003: p.560-84.
25. Özyurt M. *Tüberkülozun laboratuvar tanısında kullanılan moleküler ticari tanı sistemleri. 21.yüzyılda tüberküloz sempozyumu. II.Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu.* Samsun: 2003: 325-37.

26. Hellyer TJ, Desjardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach KD. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 2843-46.
27. Siddiqi H.S. BACTEC NAP Test. In: Isenberg HD.(Ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1992;1: 3.13.-.13.4
28. Almeda J, Garcia A, Gonzales J, Quinto L, Ventura PJ, Vidal R "et al". Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol. Infect Dis.* 2000;19: 859-67.
29. Pao CC, Yen B, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol.*1990; 28: 1877-80.
30. Persing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 1281-85.
31. Tenover F.C, Crawford JT, Huebner RE, Geiter L.J, Horsburg CR.Jr, Good RC. The resurgence of tuberculosis : is your laboratory ready. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:767-70.
32. Badak FZ, Goksel S, Sertoz R, Guzelant A, Kızırgil A, Bilgiç A. Cord formation in MB/Bact medium is a reliable criterion for presumptive Identification of mycobacterium tuberculosis complex in laboratories with high prevalence of *M.tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 4189-91.
33. Brunella F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortolli E, Fontana R. Identification of 54 Mycobacterial species by PCR-Restriction Fragment Length Analysis of the hsp65 Gene. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2799-06.
34. Wilson RW, Steingrube VA, Brown BA, Wallace R Jr. Clinical application of PCR-restriction enzyme analysis for rapid identification of aerobic Actinomycete isolates *J Clin Microbiol.* 1998;36:148-52.
35. Suffys PN, Rocha AS, Oliveira M, Campos CED, Barreto AMW, Portaels F " et.al". Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LIPA mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 4477-82.
36. Mondragon-Barreto M, Vazquez-Chacon CA, Baron-Rivero C, Acosta-Blanco P, Jost KC Jr, Balandrano S "et.al". *Salud Publica Mex.* 2000; 42(6): 484-89.
37. de Magalhaes V.D, de Melo Azevedo Fda, Pasternak J, Vale Martino MD. Reliability of hsp65-RFLP analysis for identification of *Mycobacterium* species in cultured strains and clinical specimens. *J Microbiol Methods.* 2002; 49: 295-00.
38. Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M" et al". PCR amplification and restriction endonuclease analysis of 65- kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1995. 33; 1:149-53.

## RESİMLELER LİSTESİ

<b>Resim 1.</b> Kord oluşumu .....	31
<b>Resim 2.</b> PCR sonrası ürünlerin görüntüleri.....	32
<b>Resim 3.</b> PCR sonrası ürünlerin görüntüleri.....	32
<b>Resim 4.</b> Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün HaeIII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.....	34
<b>Resim 5.</b> Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün <i>Bst</i> III enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.....	35
<b>Resim 6.</b> Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün <i>Bst</i> III enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.....	36
<b>Resim 7.</b> Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün HaeIII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.....	37
<b>Resim 8.</b> Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün <i>Bst</i> III enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.....	38
<b>Resim 9.</b> Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün HaeIII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri.....	39

## **ÖZGEÇMİŞ**

01.07.1965 Edirne doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Edirne’de tamamladım. 1982 Edirne Lisesi mezunuyum. 1988 yılı Trakya Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü mezunuyum. 1991 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansımı tamamladım. 1993 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulunda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalında görevlendirildim. 1995 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimime başladım. 1997 yılında Öğretim Görevlisi kadrosuna atandım. Halen Trakya Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulunda Tıbbi Laboratuvar Bölümünde program sorumlusu olarakta görev yapmaktayım.