

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN SOYUTLANAN  
TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKOBAKTERİLERİN  
DNA DİZİ ANALİZİ İLE İDENTİFİKASYONU**

UZMANLIK TEZİ  
Dr. O. Olcay ÖZÇOLPAN

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU

Manisa 2013

## ÖNSÖZ

Tez sürecinde ve uzmanlık eğitimimde katkılarından dolayı tez başkanı hocam Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu'na, tez danışman hocalarım; Doç. Dr. Nuri Özkütük'e, tezin moleküler aşamalarını yürüttüğümüz Ege Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Prof. Dr. Cengiz Çavuşoğlu'na ve diğer tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tezin laboratuvar aşamalarında yoğun emek harcayan teknisyen arkadaşlarım başta Şenay Yıldırım olmak üzere Ergül Utkun ve Sibel Hurma'ya ve diğer tüm laborant arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Sevgili asistan arkadaşlarıma paylaşılan tüm anılar için teşekkürler.

Beni yetiştiren ve bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan dedeme, sabrı ve desteği için eşime ve minik tansığım Ayla'ya sonsuz teşekkürler.

## İÇİNDEKİLER

### ÖNSÖZ

### İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
<b>I. GİRİŞ</b>	1
<b>II. GENEL BİLGİLER</b>	3
<b>2.1. Tarihçe</b>	3
<b>2.2. Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz ve Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Epidemiyolojisi</b>	4
<b>2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri</b>	7
<b>2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması</b>	10
<b>2.5. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı</b>	12
<b>2.6. Tüberküloz Dışı Mikobakteri İnfeksiyonlarında Tanı Kriterleri</b>	13
<b>2.7. Tüberküloz Dışı Mikobakteri İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı</b>	14
<b>2.7.1. Örneklerin işlenmesi</b>	15
<b>2.7.2. Mikroskopik inceleme</b>	16
<b>2.7.3. Kültür yöntemleri</b>	18
<b>2.7.3.1. Sıvı Besiyeri</b>	18
<b>2.7.3.2. Katı besiyeri</b>	19
<b>2.7.3.3. TDM Kültürlerinin İnkübasyonu</b>	19
<b>2.8. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin İdentifikasyonu</b>	20
<b>2.8.1. Fenotipik Testler</b>	20
<b>2.8.1.1. Üreme Hızı ve Pigment Üretimi</b>	21
<b>2.8.1.2. Sık Uygulanan Anahtar Biyokimyasal Testler</b>	21
<b>2.8.2. HPLC (High Performance Liquid Chromotography)</b>	24
<b>2.8.3. Moleküler Yöntemler</b>	25
<b>2.8.3.1. Ticari Moleküler Problar</b>	25
<b>2.8.3.2. Line Prob Teknolojisi (Bant Testleri)</b>	25
<b>2.8.3.3. PRA (Polimeraz zincir tepkimesi ve kesim enzim analizi)</b>	26
<b>2.8.3.4. DNA Dizi Analizi</b>	27
<b>2.8.3.5. Pirosekanslama</b>	28
<b>2.8.3.6. DNA Çipleri</b>	28

<b>III. GEREÇ-YÖNTEM</b>	30
<b>3.1. Çalışma Grubu</b>	30
<b>3.2. DNA Dizi Analizi</b>	30
<b>3.2.1. DNA Dizi analizi için TDM kültür stoklarının hazırlanması</b>	30
<b>3.2.2. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin DNA Dizi Analizi ile İdentifikasyonu</b>	31
<b>3.2.2.1. DNA Eldesi</b>	31
<b>3.2.2.2. hsp65 gen bölgelerinin polimeraz zincir tepkimesi ile çoğaltılması</b>	31
<b>3.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi</b>	32
<b>3.2.2.4. hsp65 geni Dizi Analizi İçin İkinci PZT(Cycle Sequencing)</b>	34
<b>3.2.2.5. 16S rDNA gen bölgelerinin PZT ile çoğaltılması</b>	35
<b>3.2.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi</b>	36
<b>3.2.2.7. 16S rDNA geni Dizi Analizi İçin İkinci PZT(Cycle Sequencing)</b>	37
<b>3.2.2.8. Dizi Analizi Öncesi PZT Ürünlerinin Saflaştırılması</b>	38
<b>3.2.2.9. Dizi Analizi ve Dizilerin değerlendirilmesi</b>	39
<b>IV. BULGULAR</b>	41
<b>4.1. Primer İzolasyona Ait Bulgular</b>	41
<b>4.2. DNA dizi analizi sonuçları</b>	42
<b>4.3. Tanımlanamayan suşlar</b>	47
<b>V. TARTIŞMA</b>	50
<b>VI. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	60
<b>VII. ÖZET</b>	61
<b>VII. ABSTRACT</b>	63
<b>IX. KAYNAKLAR</b>	65

## I. GİRİŞ

Tüberküloz tüm dünyada önemini koruyan bir hastalık olmakla birlikte son yıllarda Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) infeksiyonlarının insidansı da, immün yetmezliğe neden olan viral infeksiyonlar ve bağışıklık sistemini baskılayan tedaviler sonucu tehdit edici boyutlara ulaşmıştır (1-3). TDM infeksiyonlarındaki artış ve TDM'lerin antimikrobiyal duyarlılıklarındaki farklılıklar nedeni ile mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu klinik olarak önem kazanmıştır. Tüberküloz tanısında ilk basamak, aside dirençli boyama yöntemlerinin uygulanmasıdır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basil görülmesinden sonra, klinik ve radyolojik bulgular da tüberküloz tanısını destekliyorsa tedaviye hemen başlanmaktadır. Ancak TDM infeksiyonlarının sağaltımının tüberkülozdan farklı olması ve ilaç duyarlılığının mikobakteri türleri arasında büyük farklılıklar göstermesi nedeni ile TDM'lerin hızlı ve güvenilir yöntemler ile identifikasyonu son derece önemlidir. TDM identifikasyonunda geleneksel olarak kullanılan biyokimyasal tanımlama yöntemleri zaman alıcıdır ve tek başına kullanıldıklarında her zaman doğru sonuç vermezler. Ayrıca yeni türlerin tanısında yetersiz kalırlar. Bu nedenle günümüzde referans yöntem olarak DNA dizi analizi kullanılmaktadır (4, 5).

Bölgemizde tüberküloz insidansı, ilaç direnci ve klinik formlarına ilişkin araştırmalar olmakla birlikte, TDM'ler hakkında herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bunun en önemli nedeni, TDM'lerin identifikasyonunun yapılmaması ve bu infeksiyonların bildirimine zorunlu olmamasıdır. Bu bakterilere ait epidemiyolojik verilerin elde edilmesi laboratuvar sonuçlarının yorumlanmasına, doğru tanı ve tedaviye katkı sağlayacaktır. Çünkü doğada yaygın olarak bulunmalarına karşın, insan için potansiyel patojen olabilen TDM türleri, belirli coğrafi bölgelerde daha sık görülme eğilimindedirler (6-8).

Bu çalışmanın amacı 2007 Nisan-2011 Temmuz yıllarında çeşitli klinik örneklerden etken veya kontaminant olarak soyutlanan TDM lerin altın standart yöntem olan DNA dizi analizi ile identifikasyonlarının yapılması, dizi

analizinde iki farklı primerle elde edilen sonuçların kıyaslanması ve epidemiyolojik yönden tartışılmasıdır. TDM türlerinin epidemiyolojisine ilişkin elde edilecek bilgilerin bölgemizdeki bu bakteriler ile oluşabilecek infeksiyonların tanısına ve kontrolüne katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

## II. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Tüberküloz (TB) insanlık tarihinin en eski ve en çok korkulan hastalıklarından birisidir. İnsanların tüberküloz basili ile ilk karşılaşmasının sosyal yaşama geçtiği milattan önce 8000 yıllarında olduğu tahmin edilmektedir (9). Mısır ve Güney Amerika'da 5000-7000 yıl öncesine ait mumyalarda *Mycobacterium tuberculosis*'in izlerine rastlanmıştır. *Mycobacterium bovis*'in hayvanlardaki varlığına ait kanıtlar insanlardakinden çok daha eski olup, günümüzden 17000 yıl önceki bizonlara aittir (10). Yeni bilgi ve bulgular, *M. tuberculosis* kompleksinin atasının *M. prototuberculosis* olduğunu, ilk atadan delesyonel mutasyonlarla gelişen konak spesifik fenotipik değişimlerin 3 milyon yıl önce şekillenmeye başladığını göstermiştir (11,12).

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışında kalan tüm mikobakterilere, Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) (*nontuberculosis mycobacteria-NTM*, *Mycobacteriae other than tuberculosis- MOTT*) denir. 1950 yıllarında geleneksel TB tedavisine cevap vermeyen TB hastalarının %1-2'sinde insan patojeni olarak tanımlanmışlardır (13). Günümüzde göreceli olarak belirsiz ve özgül olmayan semptomlara neden olan 130'dan fazla TDM, çevrede her yerde, sıklıkla toprakta, hem doğal hem de işlenmiş su kaynaklarında bulunmaktadır. TDM'ler insanlarda önemli klinik tablolara neden olmaktadır. Bunlar arasında pulmoner infeksiyonlar, lenfadenitler, dissemine infeksiyonlar, lokalize deri ve yumuşak doku infeksiyonları, tendon-kemik-eklem infeksiyonları ve kateter infeksiyonları bulunmaktadır (14).

Seksenli yıllara gelindiğinde batı ülkelerinde TB sorununun artık bittiği ve hastalık eradikasyonunun yakında mümkün olabileceği düşünülüyordu. Ancak 1985 yılından itibaren bu ülkelerde, TB ve TDM insidansı, immün yetmezliğe neden olan "Human immunodeficiency virus" (HIV) gibi viral

infeksiyonlar ve uygulanan immunsupresif tedaviler nedeniyle tekrar artarak, hastalık yeniden tehdit edici boyutlara ulaşmıştır (15).

## **2.2. Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz ve Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Epidemiyolojisi**

Tüberküloz epidemiyolojisinin temel amaçları, risk altındaki toplulukları tanımlamak, infeksiyonun yaygınlığını ve toplumdaki etkilerini tespit etmek, infeksiyonun zaman içindeki değişimlerini, coğrafik dağılımını, kaynak ve bulaş mekanizmalarını belirlemek olarak sayılabilir (16).

Günümüzde dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin *Mycobacterium tuberculosis* ile infekte olduğu bilinmektedir (17). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün 2011 yılı verilerine göre dünyada TB insidansı küresel olarak yüz binde 125, yeni olgu sayısı ise 8.3 milyon olarak bildirilmiştir (18). İnfeksiyon kaynaklı önlenebilir hastalıklardan biri olmasına rağmen, zamanında tanısı konulmayıp uygun tedavi almadıkları için 2011 yılında sadece tüberkülozdan yaşamını kaybeden hasta sayısının 1.4 milyondur. Küresel olarak yeni olguların %3.7’si, önceden tedavi görmüş olguların ise %20’si çok ilaca dirençli (ÇİD) tüberküloz olgusudur. Günümüzde 22 ülke dünyadaki TB hastalarının %80’ini barındırmaktadır. Hindistan, Çin, Bangladeş, Filipinler ve Güney Afrika en çok hastanın bulunduğu beş ülkedir. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı’nın 2011 raporuna göre; Türkiye’de 2009 yılındaki toplam TB hastası 24/100 000 (17.402), yeni olgu oranı ise 22/100 000 (15.943) olarak açıklanmıştır (19).

TB ile ilgili sorunların başında tanı ve tedavideki gecikmeler ve tedaviye dirençli olgular gelmektedir. Türkiye’de 2008 yılında toplam 4963 hastanın ilaç duyarlılık testi sonuçları incelenmiştir. Olguların % 19.1’inde en az bir ilaca direnç saptanırken, en yüksek direnç oranı izoniaside (INH) karşı bulunmuştur (19). Aynı rapora göre, ilaç duyarlılık testi yapılan olguların % 5.3’ü (263 suş) çoklu ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) olarak tanımlanmış ve ÇİD oranı yeni olgularda % 3, tedavi görmüş olgularda % 18.6 olarak



saptanmıştır. Türkiye’de çeşitli bölgelerde yapılan direnç çalışmalarında da ÇİD-TB oranları % 2.2 -14.7 arasında değişmektedir (20).

Tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) ekolojisi ve fizyolojisi insanda tüberküloz hastalığı oluşturan mikobakterilerden farklıdır. Birçok TDM doğada saprofit olarak bulunur ve bu mikroorganizmaları doğal sular, musluk suyu, içme suyu sistemleri, toprak, toz ve aerosollerden izole etmek mümkündür. Farklı sıcaklık, pH, tuz ve oksijen oranlarında üremeleri çevreden ve sulardan yaygın olarak izole edilmelerinde önemli rol oynar. Bugüne kadar hayvan-insan veya insan-insan bulaşı gösterilememiştir (21). Tüberkülozdan farklı olarak TDM’lerle gelişen hastalık, çevresel organizmalarla karşılaşmaya bağlıdır. Genellikle immunsupresif tedavi alan ya da immün yetmezliği olan insanlarda hastalık oluşturmaktadır (22). İnfeksiyonların epidemiyolojisi TDM suşlarının ekolojisi ile sıkı ilişkilidir. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium simiae* ve *Mycobacterium tusciae* hastane su sistemleri ve içme suyu sistemleri ve musluk suyundan izole edilen türler arasında yer almaktadır (21). Bu TDM’lerin bazılarının (*M. avium*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*) içme suyu sistemlerinde uzun süre kalıcı olmaları dezenfektanlara karşı dirençli olmalarına bağlıdır (21, 23).

Hücre duvarında yüksek oranda lipid bulunması nedeniyle hidrofobik olmaları TDM’lerin su sistemlerinde uzun süre kalmalarını sağlayan önemli bir faktördür. Bu özellikleri sayesinde su yüzeylerinde yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Bu durum inhale edilmelerini kolaylaştırır. Hidrofobik olmaları aynı zamanda biyofilm oluşturmalarını da yardımcı olduğu için su boruları ve kateter yüzeyine tutunmaları da kolaylaşmaktadır (21).

Su sistemleri dirençli TDM suşları için de kaynak oluşturmaktadır. Finlandiya’da 1996-2003 yıllarında hasta örneklerinde izole edilen

*Mycobacterium lentiflavum* oranının %0.3'den %5.3'e yükseldiği bildirilmiştir (24). Bu artış nedeniyle içme suyu dağıtım sistemlerindeki biyofilmlerden örnek alınmış ve bu örneklerde 2-4 ilaca dirençli *M. lentiflavum* suşları izole edilmiştir. Sudan izole edilen suşlar hasta suşları ile karşılaştırıldığında, altı hasta suşunun su kaynaklı suşlarla identik olduğu bulunmuştur (24).

Son yıllarda yeni tanı yöntemlerinin gelişmesiyle beraber TDM türlerinin sayısında da artma tespit edilmiştir. Mikobakteri cinsi içerisinde doğada bulunan hali hazırda 130'dan fazla tür tanımlanmış olmakla birlikte, bu türlerin çoğunluğunun çevresel, daha az bir kısmının patojen, bir kısmının ise fırsatçı patojen olduğu kabul edilmektedir (7, 25). *M. avium* kompleks bir çok bölgede baskın görülen türdür. *M. kansasii* Orta Amerika ve İngiltere'de nispeten daha sık görülürken, *M. xenopi*'nin neden olduğu hastalıklar Kuzey Amerika, İngiltere ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde sık görülmektedir. *M. malmoense*'nin neden olduğu hastalıklar İngiltere ve Kuzey Avrupa'da yaygın görülürken, Amerika Birleşik Devletleri'nde nadirdir. Ülkemizde Batı Anadolu Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada ise *M. avium* kompleks, *M. abscessus* ve *M. kansasii*'nin en sık görülen türler olduğu bulunmuştur (7). Çevresel koşullardaki (su ve toprak kaynakları) baskın TDM türleri bölgesel farklılıkların temelini oluşturmaktadır (7, 8).

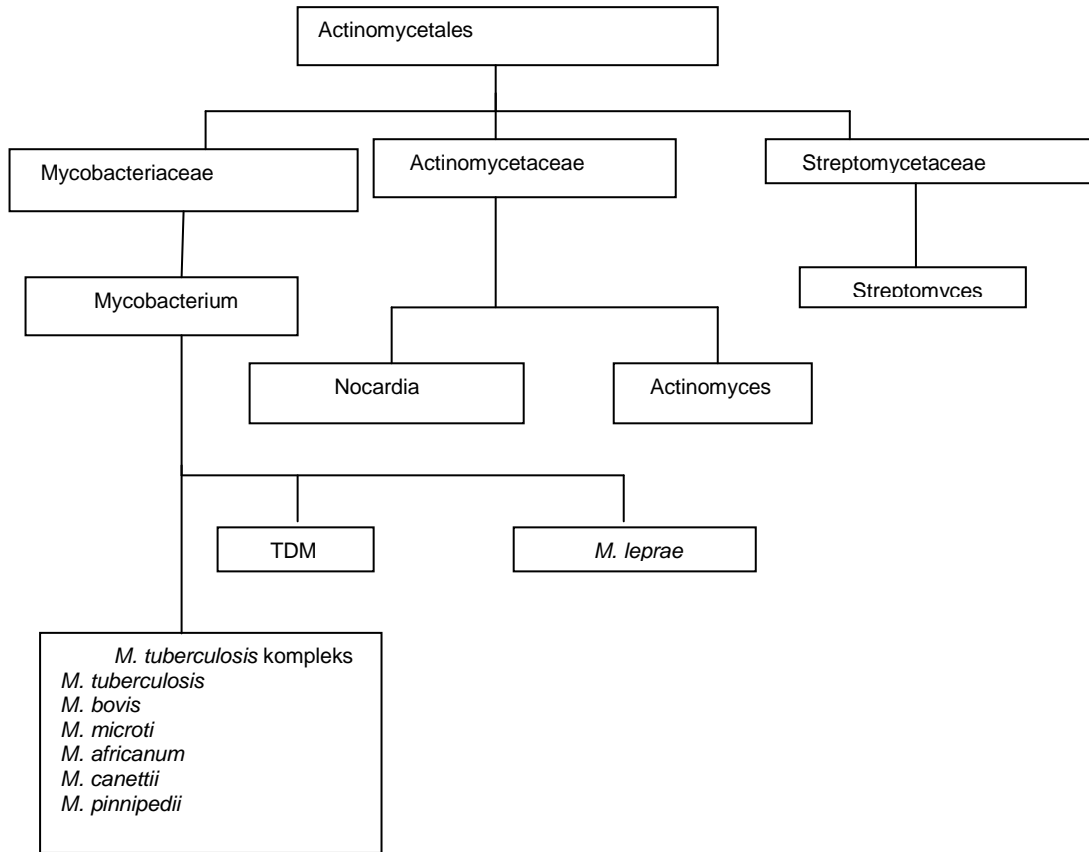
Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) bildirilen TDM görülme sıklığı yüz binde 1-1.8 arasında değişmektedir (5). Sürveyans çalışmalarının kısıtlı olmasına rağmen, TDM infeksiyonlarının tanımlamasındaki gelişmeler ve incelenen örnek sayısının artması nedeniyle bu oranların her yıl yükseldiği düşünülmektedir. Kişiden kişiye bulaş görülmediği için ABD'de TDM'ler rapor edilmemektedir (5, 26). Kanada'da pulmoner örneklerden elde edilen TDM'lerin sıklığında 1997 yılından 2003 yılına kadar ortalama %8.4 artış saptanmıştır (27).

Çoğunlukla hızlı üreyen TDM'ler (*M. abscessus*, *M. fortuitum* ve *M. chelonae*) ile birlikte *M. avium* kompleks (MAK) ve *M. xenopi* nozokomiyal infeksiyonlara neden olur. Genellikle immün yetmezliği olan insanlarda

TDM'ler önemli akciğer hastalıklarına neden olurken, akciğer dışı nozokomiyal TDM infeksiyonları günümüzde giderek artan sıklıkta rapor edilmektedir. Kardiyak cerrahide çeşitli cerrahi prosedürlerin uygulanması, enjeksiyonlar, plastik cerrahide kozmetik yüz cerrahisi girişimleri, "liposuction" uygulamaları ve lazer eşliğindei korneanın yerinde şekillendirilmesi gibi invaziv oftalmik cerrahi girişimlerin uygulanması sırasında cilt ve yumuşak doku ile ilişkili TDM infeksiyonları sık görülmektedir. Ayrıca kontamine bronkoskoplara bağlı TDM infeksiyonları da saptanmaktadır. *M. gordonae* laboratuvarlarda kullanılan tamponlar ve su kaynaklarını kontamine ederek kültürlerde yalancı pozitifliklere neden olmaktadır. Hastane infeksiyon kontrolünde çalışan hekimler, bu yalancı infeksiyonları tanıyıp, kişilerin toksik ve pahalı antibiyotikler ile uygunsuz tedavi almalarını önlemelidir (8). Hastane kaynaklı TDM infeksiyonlarını önlemek için fiber optik bronkoskopların manuel veya otomatik cihazlar ile temizliğinde çeşme suyu kullanılmaktan kaçınılmalı ve alkolle son durulama mutlaka yapılmalı, ameliyathanelerde çeşme suyu ve/veya çeşme suyundan hazırlanmış buz kullanılmamalı ve açık yaralar çeşme suyu ile yıkanmamalı, hastalar balgam örneği vermeden önce çeşme suyu içmemeli veya ağızlarını çeşme suyu ile çalkalamamalıdır. *M. abscessus*'un üremesini engelleyemediği için, lokal enjeksiyonlar öncesi deri antiseptiği olarak benzalkonyum klorid (zefiran) kullanılmamalıdır (5).

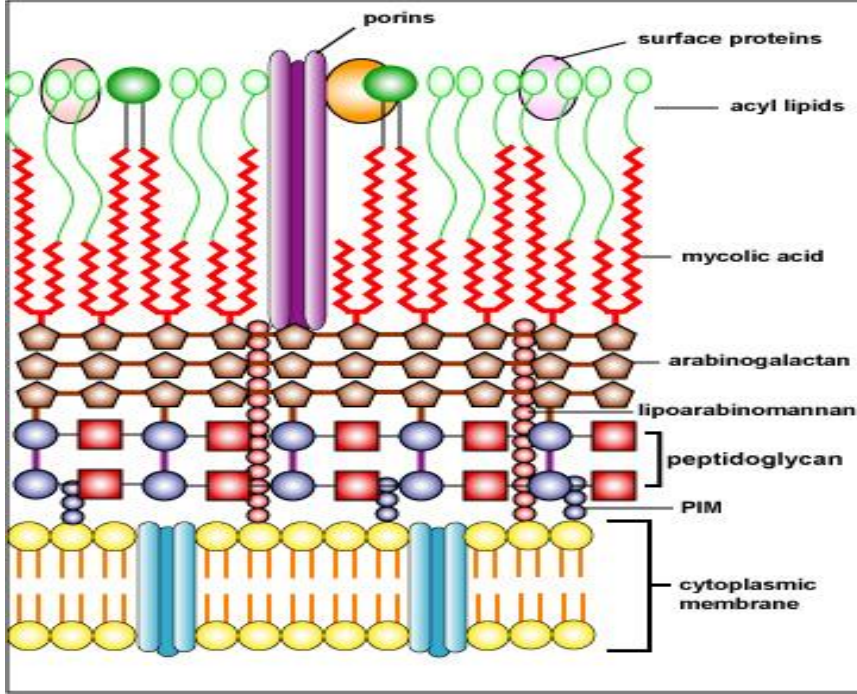
### **2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri**

*Mycobacterium* cinsi *Mycobacteriaceae* ailesinin tek üyesi olup, diğer mikolik asit içeren cinsler ile ilişkisi vardır. Mikobakteri türlerinin yüksek G+C içerikleri (*Mycobacterium leprae* hariç), diğer mikolik asit içeren *Gordonia*, *Tsukamurelle*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Corynebacterium* türleri gibidir (28).



**Şekil 1: Mikobakterilerin taksonomik ağacı**

Mikobakteriler aerop, sporsuz, hareketsiz, 0.2-0.6 µm eninde ve 1-10 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Hücre duvarları diğer bakterilere göre daha kalındır ve yüksek oranda lipid içerir. Hücre duvarının dış kısmında 60-90 karbonlu uzun ve dallı yağ asitlerinden oluşan ve bakteriye hidrofobik özellik kazandıran mikolik asit denilen yapı bulunur. Dıştan içe doğru, mikolik asit, arabinogalaktan ve peptidoglikandan oluşan bu sağlam yapı bakteriyi zırrh gibi sarar. Bu kalın hücre duvarı, mikroskopik inceleme amacıyla uygulanan birçok boyanın hücre içine geçişini engellemesi yanında mikobakterileri güçlü asit ve bazlara, birçok toksik kimyasallara, antibakteriyellere karşı korur (28).



**Şekil 2. Mikobakteri hücre duvarı**

Gram yöntemi ile kolayca boyanmamalarına rağmen mikobakteriler genellikle gram pozitif kabul edilirler (28). Hücre duvarının temel yapısı tipik gram pozitif bakterilerin hücre duvarına benzer, temel yapı peptidoglikandır. Ancak peptidoglikan tabaka arabinogalaktan-mikolik asit moleküllerine kovalan olarak bağlanmıştır ve bu tabakanın da üzerinde serbest lipitler ve polipeptitler bulunur. Hücre duvarı %60 lipit, %15 polipeptit, %25 karbonhidrat içerir. Bu özellikleri ile kendilerini hücre içi ve hücre dışı zararlılara karşı koruyan *M. tuberculosis* insanda kronik granülomatöz bir hastalık olan tüberküloza neden olur (28).

Aside dirençli boyanma özelliğinden duvar yapısındaki mikolik asit sorumludur. Hücre duvarının yapısındaki mikolik asit karbol fuksini tutmakta ve asit alkolde karbol fuksini bırakmamaktadır. Bu nedenle asido rezistan basil denilir (28). *M. tuberculosis* kompleks üyeleri hücre duvarındaki trehaloz-6-6-dimikolat (kord faktörü) maddesi varlığına bağlı olarak sıvı besiyerinde uzun kordonlar oluşturur. Kord faktörü, bakterinin virulansı ile

ilişkilidir. Kültürden hazırlanan preparatlarda bakterinin demetler halinde bir arada bulunmasından sorumlu olduğu gibi, polimorf nükleer lökositleri migrasyonunu önleme ve granülom oluşumunu stimüle etme gibi fonksiyonlarında da rol oynar. Sulfolipitler (trehaloz 2 sulfat), bakterinin hücre içinde canlı kalmasından ve kord faktörle sinerji oluşturmasından sorumludur. Isı şok proteinlerinin (65Kda, 38Kda, 12Kda), koruyucu immünite gelişmesinde ve komplikasyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir (29). TDM'lerde ise kord faktörü bulunmaz (30).

#### **2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması**

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri nedeniyle birbiriyle yakın ilişkili olan türler "kompleks" başlığı altında gruplandırılır. "*Mycobacterium tuberculosis* kompleks" (MTBC) içinde; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (*M. bovis* subs. *bovis*, *M. bovis* subs. *caprae* ve *M. bovis* subs. *BCG*), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii* ve *Mycobacterium pinnipedii* bulunmaktadır. *M. tuberculosis* kompleks dışında kalan tüm mikobakteriler TDM olarak adlandırılmaktadır (31).

*Mycobacterium* cinsi içerisindeki türlerin klinik öneminin tarihsel süreçteki değişimi, bu cins içindeki türlerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında farklı araştırmacılar tarafından değişik yöntemlerin kullanılmasına neden olmuştur. Mikobakteriler genel olarak hızlı ve yavaş üreyenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Ernest Runyon, 1950' lerin sonuna doğru *M. tuberculosis* ve *M. bovis* dışındaki mikobakterileri, üreme hızlarını, pigment üretimlerini ve koloni morfolojilerini temel alarak, fotokromojenler, skotokromojenler, nonfotokromojenler ve hızlı üreyenler olarak dört grupta sınıflandırmıştır (32). Bu sınıflandırma uzun yıllar mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak daha sonraları tıbbi önem kazanan bazı türlerin Runyon sınıflamasına göre tanımlanmasında bazı güçlüklerle karşılaşmıştır. Örneğin klinik önemi son yıllarda ortaya çıkan *M. kansasii*, genellikle fotokromojenik olmakla birlikte, bazı suşlarının

pigment oluşturmaması ve hatta skotokromojenik olması, Runyon sınıflamasına göre hangi grupta yer alacağı konusunda tartışma yaratmaktadır. Runyon'un sınıflamasının günümüzde klinik önemi olan tüm mikobakterilerin sınıflandırılmasındaki bu kısıtlamalarına rağmen, halen klinik mikrobiyoloji laboratuvarları, TDM türlerinin ön tanımlanmasında bu sınıflamadan yararlanmaktadır.

**Tablo 1. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Runyon sınıflaması**

Grup	Üreme Hızı	Pigment Üretme		Örnek Türler
		Işıқта	Karanlıkta	
I-Fotokromojenler	Yavaş	++	-	<i>Mycobacterium kansasii</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> , <i>Mycobacterium simiae</i>
II-Skotokromojenler	Yavaş	++	+	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> <i>Mycobacterium szulgai</i> <i>Mycobacterium gordonae</i>
III-Fotokromojen olmayanlar	Yavaş	--	-	<i>Mycobacterium malmoense</i> , <i>Mycobacterium xenopi</i> , <i>Mycobacterium avium</i> kompleks
IV-Hızlı Üreyenler	Hızlı	--	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium chelonae</i> , <i>Mycobacterium abscessus</i>

Günümüzde TDM sınıflandırması ise mikobakterilerin öncelikle infeksiyon oluşturdukları organ bazında yapılmaktadır. TDM'ler en sık pulmoner hastalıklara neden olurlar. Ancak dissemine hastalık, lenfadenit ve kemik-deri/yumuşak doku infeksiyonları da oluşturabilirler. *M. avium* ve *M. intracellulare* olan iki türü barındıran MAK, akciğer kaynaklı TDM infeksiyonlarından en sık izole edilen türdür. Avrupa'da ve Kanada'da *M.*

*xenopi*, özellikle İskandinav ülkeleri ve İngiltere’de *M. malmoense*, ABD, Güney Afrika ve kömür madeni bölgelerinde *M. kansasii*’nin prevalansı daha yüksektir (5, 25).

Yaklaşık 30 yıl önce *M. scrofulaceum* pek çok coğrafyada en sık izole edilen lenfadenit etkeni iken, günümüzde en sık lenfadenit etkeni MAK’dır (5, 33). MAK’ı izleyen diğer etken türler ise *M. malmoense* ve *M. haemophilum*’dur.

Akvaryum ve balıkçılıkla uğraşanlarda kutanöz infeksiyonların etkeni *M. marinum*’dur (34). Avustralya, tropikler, Afrika ve Güneydoğu Asya’da görülen tüberküloz ve lepradan sonra en yaygın infeksiyon, Buruli ülserinin etkeni *M. ulcerans*’tır. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda ve organ transplantasyonu sonrası *M. haemophilum* ağrısız yumuşak doku abselerinden sorumludur. *M. fortuitum*, *M. chelonae* ve *M. abscessus* gibi hızlı üreyen TDM’ler travma veya cerrahi sonrası infeksiyonlar oluştururlar. Kemik-eklem tutulumundan ise *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* ve *M. kansasii* sorumlu bulunmuştur (31).

Dissemine TDM infeksiyonları özellikle AIDS’li hastalarda hayatı tehdit eder. *M. avium* ve *M. kansasii* çoğunluk olsa da *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. celatum*, *M. conspicuum*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. malmoense* ve *M. simiae* AIDS’li hastalarda izole edilen diğer türlerdir (25, 31) .

## **2.5. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı**

Tüberküloz tanısı klinik, histopatolojik, immünolojik ve mikrobiyolojik olarak konulmaktadır. Tüberkülozun kesin tanısı ise klinik örneklerde tüberküloz basilinin mikrobiyolojik olarak gösterilmesi ile konur. Mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler testler mikrobiyolojik tanıda kullanılan yöntemlerdir (35). Mikobakteriyoloji laboratuvarlarının tanı ve tedaviye katkısı mikobakterinin saptanması ve identifikasyonu, tür tayini ve üretilen basilin ilaç duyarlılığının saptanmasıyla olur. Bu süreç, incelenmesi istenen klinik



örneğin hastadan uygun şekilde elde edilip, laboratuvarında homojenize ve dekontamine edildikten sonra mikroskopik incelemesinin yapılması, kültürünün yapılarak tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması ile sonuçlanır. Hastalık Kontrol ve Önlem Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tüberkülozun etkin tedavisi ve kontrolü için mikroskopik incelemenin örnek laboratuvara ulaştıktan sonra 24 saat içinde, identifikasyonunun 21 gün içinde ve antibiyotik duyarlılık testlerinin 28 gün içinde rapor edilmesini önermektedir (36). Bu süreler mikobakteriyoloji laboratuvarlarında hızlı ve güvenilir yöntemlerin kullanımını zorunlu kılmaktadır.

## **2.6. Tüberküloz Dışı Mikobakteri İnfeksiyonlarında Tanı Kriterleri**

Tüberküloz dışı mikobakterilerin neden olduğu akciğer hastalıklarının tanısı için 2007 yılında Amerikan Toraks Derneği (ATS) tarafından klinik ve mikrobiyolojik kriterler belirlenmiştir (5).

### **Klinik kriterler:**

1. Pulmoner semptomlar, akciğer grafisinde nodüler veya kaviter opasiteler olması, yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (High resolution computed tomography - HRCT) incelemesinde birden çok küçük nodüller ile multifokal bronşektazi alanlarının izlenmesi.
2. Diğer klinik tanıların dışlanması.

### **Mikrobiyolojik kriterler:**

1. En az iki ayrı balgam kültüründe TDM üremesi, (eğer sonuç negatifse yeni balgam örneğinde ARB bakı ve kültürün yapılması düşünülmelidir) veya
2. En az bir bronkoalveoler lavaj (BAL) veya bronş yıkama örneğinde kültürde TDM üremesi veya

3. Transbronşiyal veya diğer akciğer biyopsilerinde mikobakteriyel histopatolojik özelliklerin (granülomatöz inflamasyon ve ARB) bulunması ve kültürde TDM üremesi veya biyopsi materyallerinde mikobakteriyel histopatolojik özelliklerin bulunması ve bir veya daha fazla balgam veya BAL örneğinden yapılan kültürde TDM üremesi.
4. Çevresel kontaminasyona bağlı veya nadir rastlanan TDM'lerin üremesi saptandığında uzman görüşü istenmelidir.
5. TDM'ye bağlı akciğer hastalığı olduğundan şüphe edilen ancak tanı kriterlerine uymayan hastalar tanı kesin olarak konulana veya tamamen dışlanana kadar takip edilmelidir.
6. TDM'ye bağlı akciğer hastalığı tanısı konulması her zaman tedaviye başlanmasını gerektirmez. Her hastaya sağladığı fayda ve potansiyel risklere göre tedavi kararı verilir.

Klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik kriterlerin her biri, TDM'ye bağlı akciğer hastalığı tanısı konulmasında eşit derecede önemlidir ve tanının konulması için tümünün uyumlu olması gerekir. Bu kriterler en çok *M. avium* kompleks (MAK), *M. kansasii* ve *M. abscessus*' un neden olduğu akciğer hastalıklarına uymaktadır (5).

### **2.7. Tüberküloz Dışı Mikobakteri İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı (21)**

Mikobakterilerin mikrobiyolojik tanısının tam ve doğru olarak yapılabilmesi için klinik örnek uygun yerden, doğru zamanda ve yeterli miktarda alınmalı, uygun laboratuvar koşullarında işlenmelidir (37). Hasta örneği alınırken çevresel kontaminasyondan (özellikle şebeke suyu ile kontaminasyondan) kaçınılmalıdır. Örnekler formol gibi fiksatif içermeyen, sızdırmaz, tek kullanımlık steril, hasta bilgileri ile etiketlenmiş kaplarda laboratuvara taşınmalı ve rutin olarak sınıf II biyogüvenlik kabinlerinde çalışılmalıdır. Taşıyıcı besiyeri ve koruyucular genellikle önerilmez.

Laboratuvara ulaştırma bir saatten fazla süre alacaksa, örneklerin 4°C'de bulundurulması tercih edilir. Tanı için ayaktan farklı günlerde birden fazla solunum yolu örneğinin toplanması gerekli olabilir. Soğukta bekletilmeyen örneklerde, toplandıktan birkaç gün sonra bile mikobakteriler üreyebilir. Makrolid ve kinolon gibi antibiyotiklerin kullanımı hasta örneğinden TDM üremesini engelleyebildiğinden, mümkünse tanı koyucu işlemleri süresince antibiyotik kullanımı sınırlandırılmalıdır.

Pulmoner örneklerde farklı günlerde sabahın erken saatlerinde üç örnek alınması tercih edilir. Balgam çıkaramayan hastalarda balgam indüklenebilir. İndüklenmiş balgam TB tanısında etkili bir yöntemdir; ancak TDM'lerin etken olduğu akciğer hastalığının tanısında balgam indüksiyonunun etkinliğini gösteren benzer veriler yoktur.

Kan örnekleri pıhtılı veya EDTA'lı ise kabul edilmez. Kan örneğinin katı besiyerine doğrudan ekimi önerilmeyip hemen işlem görmeyecekse oda ısısında tutulmalıdır. BACTEC MYCO/F LITIC (Becton Dickenson, ABD) ve MB/BacT ALERT (bioMerieux, Fransa) gibi sürekli olarak izlenen sistemlerin, izolatör sistem ve BACTEC 13A besiyerinden daha hızlı ve onlar kadar hassas olduğu gösterilmiştir. Hızlı Üreyen Mikobakteriler (HÜM) için özel sistemler gerekli değildir, çoğu rutin kan kültür sistemlerinde iyi ürerler.

### **2.7.1. Örneklerin işlenmesi**

Kontamine bölgelerden alınan örnekler flora üyesi mikroorganizmaları içerdiğinden örnekte az sayıda bulunabilen mikobakteri üremelerini engeller veya gizler. Bu nedenle kontaminasyonu veya bakteri ve mantarlarla aşırı üremeyi en aza indirmek için, steril olmayan vücut bölgelerinden toplanan örneklerle homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemleri uygulanmalıdır. TDM'ler özellikle HÜM dekontaminasyona çok hassastır, bu işlemler potansiyel olarak mevcut mikobakterileri elimine edecek kadar ağır olmamalıdır. Mikobakteri örneklerinin dekontaminasyonunda kullanılan NaOH, bu bakterilere toksik etki yapar. Ayrıca TDM şüpheli örneklerle oksalik

asit dekontaminasyon yöntemi uygulanması, TDM'lerin kültürde üretilme şansını azaltmaktadır (5). Normal olarak steril olan bölgelerden alınan doku veya sıvı örneklerine dekontaminasyon gerekli değildir.

En yaygın kullanılan homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi, NALC-NaOH yöntemidir. Ayrıca zefiran (benzalkonyum klorid) -trisodyum fosfat yöntemi, CPC yöntemi, sülfürik asit yöntemi gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabilir. NALC-NaOH yönteminde; NALC mukolitik, NaOH dekontaminan ve sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin hacmine eşit miktarda NALC-NaOH eklenip vorteks ile iyice karışması sağlandıktan sonra 15 dakika beklenmektedir. Bu süre sonunda fosfat tamponu ile nötralizasyon sağlanmaktadır. Konsantre etmek amacıyla uygulanan santrifüj sonrası elde edilen çökeltiden preparatlar hazırlanmakta ve uygun besiyerlerine ekimleri yapılmaktadır (38). Kistik fibrozis ya da bronşektazili hastaların, aerop gram negatif basiller, özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ile kontamine örneklerinde NALC-NaOH ve %5'lik oksalik asit yöntemi beraber kullanılmaktadır.

### **2.7.2. Mikroskopik inceleme**

En kolay, en ucuz ve en sık kullanılan yöntemdir. Yaymada aside dirençli bakteri (ARB) saptanması, klinik örnekte mikobakteri varlığını gösteren ilk bakteriyolojik kanıttır. Mikroskopik incelemede, ARB görülmesi için örnekte 5.000-10.000 basil/mL bulunması gereklidir. Günümüzde halen balgam ve diğer klinik örneklerden yayma ile ARB aranması ve bunun kültür ile doğrulanması mikobakteri infeksiyonlarının tanısında altın standarttır. Mikobakteriler için başlıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir (39).

1. Karbolfuksin boyama:

-Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN)

-Kinyoun

2. Florokrom boyama:

-Auramine O

-Auramine-Rhodamine

Bu iki boyama yöntemi ile hazırlanan yaymaların raporlanmasında farklı değerlendirme ve kriterler kullanılmaktadır. En yaygın olarak, CDC kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 2) (39).

**Tablo 2. Karbol fuksin ve florokrom yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi ve sonuçların bildirilmesi**

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

TDM tanısında Florokrom, Ziehl-Neelsen ve Kinyoun boyama tekniklerinin üçü de uygulanmaktadır, ancak florokrom boyama kısa sürede daha fazla alan incelediği için daha duyarlıdır. TDM'ler özellikle HÜM, renk giderme işlemine daha hassas olabilir, dolayısıyla florokrom boya ile boyanmayabilir. Bu nedenle HÜM'den şüphelenilirse, daha zayıf renk giderici işlem uygulamak ve karbol fuksin boyama ile yaymayı boyamak faydalıdır. Mikroskopik incelemenin negatif sonuç vermesi örnekte TDM (özellikle HÜM) olmadığı anlamına gelmez.

Mikroskopik incelemenin yarı kantitatif olarak değerlendirilmesi önerilir. Değerlendirme +1'den +4'e kadar derecelendirilir ve örnekteki bakteri yükü

belirlenmiş olur (39). Çevresel kontaminasyon varsa genellikle az miktarda bakteri görülür ve yaymanın pozitif bulunma olasılığı düşüktür. Yaymanın pozitif bulunması ise örnekte yüksek miktarda mikobakteri olduğunu gösterir.

### **2.7.3. Kültür yöntemleri**

Tüberküloz dışı mikobakterilerin tanısında basilin kültürde üretilmesi önem taşır. Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen, tür düzeyinde tanımlama işlemleri için gerekli suşların elde edilebilmesine, bakterilerin canlılıklarının doğrudan gösterilebilmesine, ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastaların doğru tedavi edilebilmesine, çoğaltılan suşların daha sonraki araştırmacılar için saklanabilmesine ve epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesine imkan sağlamaları açısından mikobakterilerin tanısında halen altın standart olmaya devam etmektedir. Aside dirençli basillerin kültürde üretilebilmesi için örneğin her ml'sinde 10-100 canlı basil olması yeterlidir (40).

Üreme şansını artırmak için hem sıvı hem de katı besiyerinin birlikte kullanımı önerilmektedir. Sıvı besiyerinin tek başına kullanımı kontaminant bakterilerin aşırı üremelerinden dolayı uygun değildir. Sıvı besiyerindeki kültürler katı besiyerine göre daha yüksek oranda üreme ve daha hızlı sonuç sağlarlar. Katı besiyerinin sıvı besiyeri üzerine avantajları ise koloni morfolojisinin ve üreme hızının gözlenmesi, birden fazla mikobakteri türü ile oluşan infeksiyonların fark edilmesi ve sıvı besiyeri kültürleri kontamine olduğu zaman yedek olarak kullanılması olarak sıralanabilir (37).

#### **2.7.3.1. Sıvı Besiyeri**

En yaygın kullanılan sıvı besiyerleri sistemlerinden biri nonradyometrik mikobakteri üreme indikatör tüpü (MGIT) (Becton Dickinson, Sparks,MD)'dir, floresanlı modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içerir. Mikobakteri üredikçe ve mevcut oksijeni tükettikçe, indikatör ultraviyole ışığına maruz kaldığı zaman floresan verir. Sıvı besiyerlerinde TDM'ler için ortalama tayin zamanı

< 7 gündür. Yayma negatif örnekler ve tedavi edilmiş hastalardan alınan örnekler için de üreme süresi kısadır (21, 37).

### **2.7.3.2. Katı besiyeri**

Yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelemek mümkündür. Yumurta bazlı besiyerleri arasında bugün en yaygın kullanılan Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeridir. Ancak Petragnani ve American Trudeau Society gibi besiyerleri de farklı durumlarda tercih edilebilen yumurta bazlı besiyerlerindedir. Özellikle primer izolasyonda LJ besiyerinin tercih edilme nedenleri arasında, tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve ekonomik olmaları sayılabilir (38).

Yumurta bazlı besiyerlerinin opak görümlü olmasına karşın, agar temelli besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görmek mümkündür. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar bazlı besiyerleridir (38). Agar bazlı besiyeri duyarlılık testi için de kullanılabilir. *M. haemophilum*, *M. genavense*, *M. avium subsp. paratuberculosis* ve *M. ulcerans* kültürde üremeleri için besiyerine özel ilaveler gerektiren zor üreyen mikobakteri türleridir. *M. haemophilum* ferröz amonyum sitrat, hemin veya hemogloblin gibi demir içeren bileşikler besiyerine eklendiği zaman ürer. *M. haemophilum* sıklıkla deri, yumuşak doku infeksiyonlarına neden olduğundan üremesi için deri lezyonlarından, eklemlerden veya kemiklerden alınan örneklerin uygun ortamlarda kültürünün yapılması gereklidir. *M. genavense*, *M. avium subsp. paratuberculosis* için mikobaktin J gereklidir ve *M. ulcerans* yumurta sarısı ilavesi ile üretilebilir (37).

### **2.7.3.3. TDM Kültürlerinin İnkübasyonu**

Çoğu TDM kültürü için optimal inkübasyon ısısı 28-37 °C'dir. Klinik olarak anlamlı, yavaş üreyen mikobakterilerin çoğu birincil izolasyonda 35-37°C'de iyi ürerler. Bu yüzden mikobakterileri üretebilme şansını arttırmak

için iki ayrı besiyeri setine ekim yapılmalı biri 28°C - 30°C diğeri de 35°C - 37°C arasında inkübasyona tabi tutulmalıdır. *M. haemophilum* 28-30°C arasındaki ısıda üremeyi tercih ederken, *M. ulcerans* 25-33 °C'de yavaş ürer. *M. chelonae*'nin bazı suşları ise 28-33°C arasında ısıya ihtiyaç duyarlar. HÜM ve *M. marinum* kültürleri 28-30 °C'de inkübe edilmelidir (21).

TDM türlerinin çoğu pasaj yapılan kültürlerde 2-3 hafta içinde ürer. *M. ulcerans* veya *M. genavense*'i tayin etmek için en az 8-12 hafta süreyle inkübe etmek gerekir. HÜM genellikle pasaj kültürünün ilk yedi günü içinde üremektedir. Sıvı bazlı sistemlerde daha erken üreme görülebilmektedir. Mikobakterilerin üreme zamanı TDM'lerin ayırımında önemli olduğu için mutlaka kaydedilmelidir (5).

## **2.8. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin İdentifikasyonu**

Antimikrobiyal duyarlılıktaki farklılıklardan dolayı tür düzeyinde identifikasyon giderek önem kazanmaktadır (5). Her mikobakteriyoloji laboratuvarının tüm suşları tanımlayabilecek düzeyde olması gerekli değildir. Ancak tüberküloz basillerinin etken olma sıklığı ve infektivitesi göz önüne alındığında, en azından *M. tuberculosis* kompleksin TDM'lerden ayırımında kullanılan anahtar testlerin uygulanması gerektiği düşünülmektedir (41). TDM infeksiyonlarına özgü klinik bulgular olmadığı için, kesin tanı mikrobiyolojik inceleme ile konmaktadır. Bu mikroorganizmalar tanımlanırken hem fenotipik, hem de genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır. Mikobakterilerin tanımlanmasında 1980'li yıllara kadar fenotipik özellikli testler yaygın olarak kullanılırken, günümüze kadar olan süreçte moleküler yöntemlerdeki ilerlemenin etkisiyle genotipik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (42).

### **2.8.1 Fenotipik Testler**

Mikobakteri türlerinin tanımlanmasında fenotipik karakterlerin belirlenmesi için koloni morfolojisi, boyanma özellikleri ve biyokimyasal reaksiyonlar kullanılır (21). Mikobakteri türlerini önce Runyon' un önerdiği



şekilde gruplandırmak, sonra her grupta sık rastlanan türlerle o coğrafik bölgedeki mikobakteri türlerinin dağılımının bilinmesi ve düşünülen türlerde en çok pozitif sonucu veren biyokimyasal deneyleri seçmek kabul edilmiş esastır (42). Tüberküloz dışı mikobakteriler öncelikle üreme süreleri, üreme ısıları, koloni görünüşleri ve pigment oluşturma özelliklerine göre gruplandırılır. Bu gruplama sonunda tanımlanacak olan mikobakteriler için çok sayıda biyokimyasal testler uygulanmaktadır. Bunlar arasında; arilsülfataz, katalaz, niasin akümülyasyonu, pirazinamidaz ve üreaz üretimi, sodyum klorür toleransı, tiofen-2 karboksilik asit hidrazid ile üremenin inhibe edilmesi, nitrat ve tellürit redüksiyonu, tween 80 hidrolizi sayılabilir.

#### **2.8.1.1. Üreme Hızı ve Pigment Üretimi**

Tür tayininde bakteri üretildikten sonra ilk olarak üreme hızı ve pigmentasyonuna göre ayırım yapılır. Pasaj ile elde edilen kültürde ilk yedi günde veya daha kısa sürede koloni oluşturan TDM suşları 'hızlı üreyen mikobakteri (HÜM)' olarak adlandırılırken kültürde koloni oluşturmak için yedi günden daha uzun süre gerektiren TDM suşları 'yavaş üreyen mikobakteri' olarak tanımlanır.

Geleneksel olarak TDM aynı zamanda pigment üretimine göre üç gruba (skotokromojen, fotokromojen ve nonkromojen) ayrılır. Bu üreme özellikleri modern mikobakteri laboratuvarlarında nadiren uygulanır, fakat pigment oluşturma ve düz koloni morfolojisine sahip olan TDM'leri, pigmentsiz ve kaba koloni oluşturan MTBC suşlarından hızla ayırmasını sağlar (21).

#### **2.8.1.2. Sık Uygulanan Anahtar Biyokimyasal Testler**

**Katalaz testi:** Mikobakterilerde katalaz aktivitesini saptamak için biri semikantitatif test ve diğeri ısıya stabil katalaz testi olmak üzere iki test kullanılır. Semikantitatif test mikobakterileri, hava kabarcıklarının yüksekliğinin <45mm veya >45mm olmasına göre değerlendirilerek düşük ve

yüksek katalaz reaksiyonu oluşturanlar olmak üzere iki gruba ayırır. Isıya stabil katalaz testinde, katalaz enziminin 68°C de 20 dakika ısıtıldığında inaktive olup olmadığı araştırılır. Enzimin ısı ile inaktivasyonu bazı mikobakteri türlerinin ayırt edilmesinde tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılan hidrojen peroksit, diğer bakterilerde bulunan enzimin araştırılmasında kullanılan ayıraçtan farklıdır. Hidrofobik ve kümeli olan mikobakterilerin dağılmasını ve enzimin kolayca açığa çıkmasını sağlamak için testte %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile güçlü bir deterjan olan %10 Tween-80'nin karışımı kullanılır (29).

**Niasin testi:** Bu testin temeli, *M. tuberculosis* ile *M. simiae* ve *M. chelonae* suşlarının nikotinic asiti diğer mikobakterilere göre daha az metabolize etmeleri sonucu, besiyerine niasin salmaları ve bu niasinin çeşitli kimyasallarla saptanması esasına dayanmaktadır (29).

**Tiofen-2 karboksilik asit hidrazid (T2H) testi:** T2H ile üremenin inhibe edilmesi, niasin pozitif *Mycobacterium bovis*'i, *M. tuberculosis* ve diğer non kromojenik yavaş üreyen mikobakterilerden ayırmak amacıyla kullanılır. *M. tuberculosis* ve yavaş üreyen mikobakterilerin çoğu içinde T2H bulunan Middlebrook besiyerinde ürerken, *M. bovis* bu besiyerinde üreyemez (29).

**Pirazinamidaz testi:** Pirazinamidaz enzimi pirazinamidi (PZA) pirazinoik asit ve amonyağa hidrolize eder ve ortaya çıkan pirazinoik asit, besiyerine ferröz amonyum sülfat eklenmesi ile saptanabilir. Bu test ile *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare* ve *M. marinum* pozitif sonuç verirken, *M. bovis* ile *M. kansasii* negatif sonuç vermektedir (29).

**MacConkey agarda üreme testi:** *M. fortuitum* ile *M. chelonae*'nin diğer mikobakterilerden ayrılmasını sağlar. Sadece bu iki mikobakteri türü MacConkey agarda üreme gösterirler (29).

**Üreaz testi:** Bir suşun üreyi amonyak ve CO<sub>2</sub> e çevirebilme özelliği skotokromojen ve kromojen olmayanların tanımlanmasında faydalıdır. *Mycobacterium scrofulaceum* üreaz pozitifken *M. avium* ve *M. intracellulare* üreaz negatiftir. Üreaz testi özellikle pigment yapan *M. avium* suşlarının tanımlanmasında yardımcıdır (29).

**Tween 80 hidroliz testi:** Bazı mikobakteriyel türler tarafından üretilen lipazlar “polyoxyethylene sorbitan monooleate” (Tween 80) deterjanı hidrolize ederek oleik asit ve “polyoxyet-hylene sorbitol” açığa çıkar. pH’sı 7 olan test besiyeri içindeki nötral kırmızısı Tween 80 tarafından bağlanır ve nötral pH’da kehribar rengindedir. Eğer Tween 80 hidrolize edilirse nötral kırmızısı artık bağlı değildir ve pH 7’de kırmızı renge döner. Tween 80 hidroliz testi yavaş üreyen TDM türleri arasında ayırım için kullanılır (29).

**Nitrat redüksiyon testi:** Mikobakteriler nitroredüktaz enzimi üreterek nitratları nitritlere indirgeyebilirler. Nitrat redüksiyonu testi; koloni morfolojisi, üreme hızı ve pigment üretme özellikleri birbirine benzer olan mikobakterileri ayırt etmede değerlidir. *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, bazı saprofit nonkromojenler, *M. smegmatis* ve *M. fortuitum* grubu nitrat redüktaz pozitifdir (29).

**Sodyum klorür tolerans testi:** %5’lik NaCl içeren LJ besiyerinde üreyebilme yeteneği, 28°C’de inkübe edildikleri zaman, yavaş üreyenlerden sadece *Mycobacterium trivale*, *M. flavescens*’in bazı suşları, *M. abscessus* ve *M. fortuitum* için ortak özelliktir (29).

Suşların MTBC ve TDM olarak ayırımında sınırlı bir identifikasyon sağlayan bazı kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bunlar arasında; p-nitrobenzoat, hidroksilamin hidroklorür, azaguanin, nitroksolin ve NAP (p-nitro- $\alpha$ -acetylamino- $\beta$ -hydroxypropiofenone) sayılabilir. MGIT 960

sisteminde p-NBA (paranitrobenzoik asit) kullanılarak MTBC ve TDM ayrımı yapılabilmektedir (21).

Biyokimyasal testler ancak belli mikobakteri türlerinin ayırt edilmesini sağlayabilmektedir. Kesin tanımlama için bu testlerin birkaçının bir arada uygulanması gerekmektedir. Son yıllardaki çalışmalar, sadece geleneksel biyokimyasal analizlerin rutinde kullanımının zaman alıcı olması nedeniyle tanıda önemli gecikmelere yol açtığını göstermektedir (42). Geleneksel testlerin tek başına kullanımı ile yeni tanımlanan TDM 'in birçoğunun identifikasyonu yapılamamaktadır. Bu nedenle HPLC ve moleküler yöntemleri içeren yeni yöntemler tanıda kullanılmaktadır (42).

### **2.8.2. HPLC (High Performance Liquid Chromotography)**

HPLC yavaş üreyen TDM'lerin birçoğunu hızlı ve güvenilir olarak tanımlayabilen bir yöntemdir. Mikobakterilerin hücre duvarından elde edilen mikolik asitlerin kromotografik olarak değerlendirilmesine dayanır (42). Ancak *M. chelonae*-*M. abscessus* grubu üyelerini birbirinden ayırt edemeyebilir. Bu grubun üyeleri için nükleik asit çoğaltma yöntemleri veya DNA dizi analizi yöntemi kullanılmalıdır. HPLC sıvı besiyerinde üreyen kültürlerde doğrudan uygulanabilir. Aynı zamanda ARB olumlu hasta örneklerinden MAK tanımlanması için de doğrudan kullanılabilir. Ancak yeni türlerin ayrımında HPLC yöntemi yeterli değildir. *M. simiae* kompleks içindeki türlerin ayrımında ve *M. fortuitum* ile *M. smegmatis* grubu içindeki bazı türlerin ayrımında zorluk olabilir.

HPLC için başlangıçta gerekli donanım maliyetlerinin yüksek (yaklaşık olarak 50.000 dolar) olması ve otomatize olmayan bu sistemlerin kullanımının büyük deneyim gerektirmesine karşın, ticari moleküler sistemler ile karşılaştırıldığında test başına malzeme maliyeti ekonomiktir (42). Ancak mikolik asit analizleri moleküler yaklaşımların duyarlılık ve özgüllüğünü sağlayamaz. Bu nedenle yeni moleküler yöntemlerin yaygınlaşması ile

TDM'lerin tanımlanmasında HPLC kullanımının giderek azalacağı düşünülmektedir.

### **2.8.3. Moleküler Yöntemler**

#### **2.8.3.1. Ticari Moleküler Problar**

Bazı TDM türlerinin tanımlanmasında 16S rRNA'yı hedef alan akridiyum ester işaretli DNA problar yaygın olarak kullanılmaktadır (42). MAK (veya *M. avium* ve *M. intracellulare* için ayrı), *M. kansasii*, *M. gordonae* ve *M. tuberculosis* kompleks için ticari olarak problar vardır (AccuProbe; Gen-Probe Inc, San Diego). Problar katı veya sıvı besiyerinde bulunan kökenlere uygulanabilir. Test süresi yaklaşık olarak iki saattir. Uygulanması kolay ve pahalı cihaz gerektirmeyen bir yöntemdir. Prob hibridizasyon yönteminin duyarlılığı %85-100, özgüllüğü ise %100 olarak bildirilmektedir. Bu yöntemin en önemli eksikliği az sayıda TDM türünü tanımlayabilmesidir. Ayrıca *M. tuberculosis* ile *M. celatum* arasında çapraz tepkime olabileceği dikkate alınmalıdır.

#### **2.8.3.2. Line Prob Teknolojisi (Bant Testleri)**

Line prob teknolojisi biotin ile işaretli primerlerin kullanıldığı polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ve işaretli amplikonların bir membran bant üzerinde paralel hatlar olarak tespit edilmiş tamamlayıcı problar üzerine revers hibridizasyonu temeline dayalıdır. Inno LİPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Belçika) ve GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience, Almanya) olmak üzere iki farklı ticari sistem vardır (42).

Inno LİPA yöntemi 16S-23S rRNA "internal transcribed spacer" bölgesini hedef alır. Tek bir bant test ile en sık rastlanan 17 mikobakteri türü (*M. tuberculosis* kompleks, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. fortuitum* kompleks, *M. malmoense*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. haemophilum*, *M.*

*marinum/M. ulcerans* ve *M. celatum*) tanımlanabilmektedir. Testin duyarlılığı %100, özgüllüğü %94 olarak bildirilmiştir.

GenoType Mycobacterium yönteminde 23S rRNA'yı hedef alan multipleks PZT ve ardından line prob teknolojisinin kullanıldığı revers hibridizasyon işlemi uygulanmaktadır. Bu yöntem için geliştirilmiş üç ayrı kit vardır: *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin birbirinden ayırt eden GenoType MTBC kiti, sık rastlanan mikobakterileri ayırt eden GenoType Mycobacterium CM kiti ve az rastlanan mikobakterileri tanımlayan GenoType Mycobacterium AS kiti. CM ve AS kitleri birlikte kullanıldığında, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. peregrinum*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genovense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. gastri*, *M. asiaticum* ve *M. shimoidei* gibi türleri de içeren 30'a yakın TDM tanımlanabilmektedir. Testin uygulanması ve yorumlanması kolaydır. DNA dizi analizi ile karşılaştırıldığında CM kitinin duyarlılığı %97, özgüllüğü %92, AS kitinin duyarlılığı ve özgüllüğü %99 olarak bildirilmiştir (42).

#### **2.8.3.3. PRA (Polimeraz zincir tepkimesi ve kesim enzim analizi)**

Mikobakterilerin kısa sürede tiplendirilmesi amacıyla geliştirilen PRA yöntemi, en sık *hsp65*, *rpoB*, *16S rDNA* gen bölgelerinin, restriksiyon enzimleriyle kesilmesi temeline dayanmaktadır (42). Elde edilen restriksiyon parçaları poliakrilamid jelde yürütülerek ayrıştırılmaktadır. Poliakrilamid jel elektroforezi sonrasında görülen bantın molekül ağırlığının tam olarak anlaşılabilmesi için molekül ağırlık standartı ile karşılaştırılması gereklidir. İki restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda, 80'e yakın mikobakteri türünün herbiri kendine özgü bantlar oluşturduğundan, oluşan bantların molekül ağırlığının belirlenmesi mikobakterilerin identifikasyonunu sağlamaktadır. Test hem katı, hem de sıvı kültür sistemlerinde çalışılabilir. Canlı bakteriyi

gerekli değildir. Birçok türü tanımlayabilmesi, pahalı donanım gerektirmemesi testin olumlu yanlarıdır.

#### 2.8.3.4. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi mikobakterilerin tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilmektedir (42). Bu yöntemde önce hedef gen bölgesi PZT ile çoğaltılır ve ardından otomatik dizileme cihazı kullanılarak ampikonların nükleotid dizileri belirlenir. Elde edilen dizi 16S rDNA tarafından kodlanan ve hem korunmuş, hem de oldukça değişken (hipervariabl) bölgeler içeren 16S rRNA genine ait bir dizidir. Mikobakterilerin tanımlanması için A ve B bölgeleri olarak bilinen iki değişken dizinin değerlendirilir. A bölgesinin dizi analizi genellikle TDM türlerinin çoğu için yeterli olmaktadır. Ancak bazen B bölgesinin de analizi gerekebilir. Özellikle tek başına A bölgesinin analizi ile birbirinden ayırt edilemeyen türler olan *M. kansasii*/*M. gastri*, *M. ulcerans*/*M. marinum*, *M. shimoidei*/*M. trivale* gibi türler için her iki gen dizisi de incelenir. *M. chelonae* ve *M. abscessus* ise her iki gen bölgesi ile ayırt edilemeyebilir. Bu iki tür için diğer 16S rRNA gen alanları analiz edilmelidir. 16S rRNA geni, bütün bakterilerde çok iyi şekilde korunmuş olması ve türe özgü değişen diziler içermesi nedeniyle bakterilerin moleküler tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilen bir hedef bölgedir.

16S rRNA dizi analizi, çoğu mikobakteri türünün tanımlanmasını sağlamasına rağmen, *M. tuberculosis* kompleks üyelerini ayırt edemez. Benzer olarak önemli bir patojen olan *Mycobacterium kansasii* ile patojenik olmayan *M. gastri*, *M. marinum* ile *M. ulcerans*' in ve *M. malmoense* ile *M. szulgai*' nin dizi analizi aynıdır. Bunların ayırt edilmesi için ek bölgelerin dizi analizi gerekmektedir (43, 44).

Bu yöntem DNA polimerazların dNTP'ler yanında, deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de substrat olarak kullanmaları esasına dayanır. Sentezlenen DNA iplikçığıne dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP eklenmesi halinde zincir

uzaması durmaktadır. Mikobakterilerin tanımlanması amacıyla dizi analizi için hedef olarak seçilen en önemli gen bölgeleri, 16S rRNA, *hsp 65*, ITS, *gyrB*, *recA* ve *rpoB* 'dir.

Dizi analizi için kullanılacak GenBank, RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microsystems database) EMBL (European Molecular Microbiology Laboratory) gibi çeşitli veri tabanları internet aracılığı ile kullanılabilir. MicroSeq Sistemi (Applied Biosystems, CA) ticari bir 16S rDNA dizileme sistemidir. Bu sistem ile TDM'lerin 500 bp uzunluğunda DNA dizisi otomasyon ile belirlenebilmektedir. Bu sistemin en önemli eksikliği, suşların veritabanındaki diziler ile tam olarak uyuşmamasıdır. Bu suşlar, veritabanındaki diziler ile arasındaki farklılıklara göre "en yakın tür" olarak bildirilirler (42).

#### **2.8.3.5. Pirosekanslama**

Pirosekanslama (Biotage, Upsala, İsveç) DNA yapımı sırasında pirofosfat (PPi) salınımını saptayan yeni bir yarı otomatize DNA dizileme yöntemidir. Enzimatik tepkime görünür ışık olarak saptanabilmekte ve bu ışık luminometrik olarak ölçülmektedir. Işık miktarı bağlanan nükleotidlerin sayısı ile orantılıdır. Pirosekanslama kısa dizilerin (20-30 baz) hızla saptanmasında başarılı olmakla birlikte 300-500 bp dizilerin saptanmasında geleneksel DNA dizileme yöntemi (Sanger) kadar ayırt edici değildir. Bu yöntemi sınırlandıran en önemli sorun, diğer dizileme yöntemlerinde olduğu gibi kullanılan veritabanlarının kalitesinin ve güvenilirliğinin sorgulanabilir olmasıdır (42).

#### **2.8.3.6. DNA Çipleri**

Bu yöntem 16S rRNA genine özel problemleri içeren bir DNA çipine bilinmeyen bir kökenin floresan işaretli ampikonlarının hibridize edilmesi temeline dayanır. Tek aşamada birçok kökenin tanımlanmasına olanak sağlar. *M. tuberculosis*'in rifampisin direncine yol açan *rpoB* gen



mutasyonlarının belirlenmesinde ve TDM'lerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemin en olumsuz yönü pahalı olmasıdır (42).

Sonuç olarak hızlı ve güvenilir olmaları nedeni ile moleküler yöntemler TDM'lerin tanısında büyük önem taşırlar. Moleküler yöntemler geleneksel yöntemlerin yerini tam olarak almasa da laboratuvar uygulamalarına dahil edilmelidir. Ancak test seçiminde maliyet göz ardı edilmemelidir. Ülkemiz için her laboratuvarında bu yöntemlerin uygulanması yerine öncelikli olarak *M. tuberculosis* kompleks'in tanımlanması ve diğer mikobakterilerin tiplendirme amacı ile referans laboratuvarına veya büyük ölçekli laboratuvarlara gönderilmesi daha akılcı bir yaklaşım olacaktır.

### **III. GEREÇ-YÖNTEM**

#### **3.1. Çalışma Grubu**

Projede Nisan 2007-Temmuz 2011 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden soyutlanan ve NAP inhibisyon testi (Becton Dickinson, ABD) ve BD MGIT TBC İdentifikasyon Testi (Becton Dickinson, ABD) ile TDM olarak tanımlanan suşlar geriye dönük olarak taranmıştır. Bu süre içinde izole edilip stoklanmış olan toplam 126 suşun 110 tanesi çalışmaya alınmıştır. Bu örneklerin PZT ve DNA dizi analizi aşamalarında ürün kayıpları nedeniyle 101'i çalışmaya dahil edilmiştir.

#### **3.2. DNA Dizi Analizi**

Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin identifikasyonunda DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Dizi analizi için öncelikle hsp65 gen bölgesi hedef olarak seçilmiş, analiz sonucu farklı mikobakteri türleri olarak tanımlananlar ya da aynı tür içinde yer alıp farklı diz varyantlarına sahip olanlar içinden randomize olarak seçilen suşlardan doğrulama için, 16S rRNA gen bölgesi hedef alınarak ikinci kez dizi analizi yapılmıştır.

##### **3.2.1. DNA Dizi analizi için TDM kültür stoklarının hazırlanması**

Celal Bayar Üniversitesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanan TDM kültür stoklarının her biri vida kapaklı tüplerdeki 7H9 Middlebrook sıvı besiyerine aktarılarak süspansiyonları hazırlanmıştır. Kontrol amacı ile her süspansiyondan mikroskopik inceleme yapılarak ARB'lerin varlığı gösterilmiştir.

### **3.2.2. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin DNA Dizi Analizi ile İdentifikasyonu**

Bakteri süspansiyonları DNA ekstraksiyon, PZT, pürifikasyon ve dizi analizi işlemlerinin yürütüleceği Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına sıvı besiyerleri içerisinde uygun koşullarda nakledilmiştir.

TDM'lerin DNA eldesi; hsp65 ve 16S rRNA gen bölgelerine yönelik, otomatize dizi analizi cihaz üreticisinin rehberindeki öneriler temel alınarak yapılmıştır.

#### **3.2.2.1. DNA Eldesi**

1.5 ml ependorf tüplere vida kapaklı tüplerdeki süspansiyonlardan 1ml aktarılmıştır. Tüpler 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Çökelti üzerine 250 µL 1X TE tamponu eklenerek vortekslenmiş ve 95 °C'de 20 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Sonikatörde 15 dakika sonikasyona maruz bırakılan örnekler, 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım DNA ekstraktı olarak -20 °C'de saklanmıştır.

#### **3.2.2.2. hsp65 gen bölgelerinin polimeraz zincir tepkimesi ile çoğaltılması**

Tüberküloz dışı mikobakterilerin DNA'larının hsp65 gen bölgeleri PZT ile çoğaltılmıştır (45, 46).

##### **Gereçler:**

1. DNA ekstraktı
2. 25 mM MgCl<sub>2</sub>
3. dH<sub>2</sub>O
4. 10 mM dNTP
5. MgCl<sub>2</sub> içermeyen 10X buffer
6. Taq DNA polimeraz

7. Primer 1(Tb 11) : 5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3'

8. Primer 2(Tb 12) : 5' CTTGTCTGAACCGCATACCCT 3'

**Yöntem:**

1. Her örnek için aşağıda belirtilen miktarlarda PZT karışımı hazırlanmıştır.

dH <sub>2</sub> O	31,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5,0 µl
dNTP 10 mM	1,0 µl
10 X Buffer	5,0 µl
Primer 1 (25 mM)	1,0 µl
Primer 2 (25 mM)	1,0 µl
Taq DNA polimeraz	0,5 µl
Toplam hacim	45,0 µl

2. Çalışılacak örnek sayısı kadar hazırlanan karışım 0.5 mL'lik tüplerin her birine 45 µL dağıtılmıştır.

3. Üzerlerine 5 µL ekstrakte DNA eklenmiştir.

4. Karışım ısı döngü cihazına yerleştirilerek aşağıdaki siklus programı uygulanmıştır.

95 °C de	10 dakika ön denatürasyon	
94°C de	1 dakika	} 40 döngü
60°C de	1 dakika	
72°C de	1 dakika	
72 °C de	15 dakika son uzatma	
4 °C de	∞	

5. Amplifikasyon ürünü saptama basamağının uygulanacağı zamana kadar 2–8°C'de üç gün veya -20°C de altı ay saklanmıştır.

**3.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi**

Tüberküloz dışı mikobakterilerin DNA'larından PZT ile çoğaltılan 441 bp'lik hsp65 geni agaroz jel elektroforezi uygulanarak gösterilmiştir.

### **Gereçler:**

1. EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) stok solüsyonu (0,5M)

2. Tris-Borik asit-EDTA (TBE 10X; Stok TBE solüsyonu)

Trizma base (Sigma T1503) 54 g

Borik asit (Sigma B6768) 27,5g

Na<sub>2</sub>EDTA (0,5M) 20 mL

450 mL distile su içerisinde eritilmiş, soğuduktan sonra üzerine 20 ml Na<sub>2</sub>EDTA eklenerek 500 mL'ye tamamlanmıştır.

Kullanım sırasında stok TBE solüsyonu 1/10 sulandırılmış ve TBE 1X olarak kullanılmıştır.

3. Etidyum bromit solüsyonu (EtBr) (10 mg/mL)

Etidyum bromit (Sigma E8751) 1 g

Distile suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Işıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

4. Jel yükleme tamponu (Fermentas #R0629) -20 °C'de saklanmıştır.

5. 50 bp. DNA ladder -20 °C'de saklanmıştır.

6. Agar

### **Yöntem:**

1. %2' lik agaroz jel (%2' lik agaroz jel = 1.4 g agaroz, 70 mL 1 X TBE, 2.8 µL EtBr) elektroforez tankı kullanılarak dökülmüş ve katılaşması için 20 dk beklenmiştir.

2. İlk kuyucuğa standard belirleyici olarak 50 bp. DNA ladder yüklenmiştir.

3. İkinci kuyucuktan itibaren 2 µL jel yükleme tamponu ile homojen olarak karıştırılan her primer için ayrı 7 µL PZT ürünü yüklenmiştir.

4. 15 dk. 200 voltta elektroforez yapılmış ve UV transluminatör üzerinde jel fotoğraflanmıştır.

### 3.2.2.4. hsp65 geni Dizi Analizi İçin İkinci PZT (Cycle Sequencing)

#### Gereçler:

1. Terminator Ready Rection Mix (TRRM)
2. *hsp65* primer-1 (Tb 11): 5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3'
3. *hsp65* primer-2 (Tb 12): 5' CTTGTCTGAACCGCATACCCT 3'
4. ddH<sub>2</sub>O

#### Yöntem:

1. Jel elektroforezde görüntülenen DNA ürünleri ikinci PZT için aşağıda belirtilen miktarlarda her örnek için hazırlanmıştır.

#### Sens

TRRM	4.0 µl
Ürün	1 µl (1/5, 1/3 sulandırıldı)*
<i>hsp65</i> primer-1	1 µl (12.5 pmol)
ddH <sub>2</sub> O	4.0 µl
Toplam	10 µl

#### Antisens

TRRM	4.0 µl
Ürün	1 µl (1/5, 1/3 sulandırıldı)*
<i>hsp65</i> primer-2	1 µl (12.5 pmol)
ddH <sub>2</sub> O	4.0 µl
Toplam	10 µl

\* Jel elektroforezde saptanan bantın kalınlığına PZT ürünleri 1/3 veya 1/5 oranında sulandırılmıştır.

2. Çalışılacak örnek sayısı kadar hazırlanan karışım 0.5mL'lik tüplerin her birine 9 µL dağıtılmış ve üzerlerine 1 µL ürün eklenmiştir.

3. Isı döngü cihazında aşağıdaki siklus programı uygulanmıştır.

95 °C	5 dakika	} 30 döngü
95 °C	30 saniye	
50 °C	10 saniye	
60 °C	4 dakika	
4 °C	∞	

### 3.2.2.5. 16S rDNA gen bölgelerinin PZT ile çoğaltılması

Tüberküloz dışı mikobakterilerin 16S rDNA gen bölgeleri iki ayrı primer seti kullanılarak PZT ile çoğaltılmıştır (45, 46).

#### Gereçler:

1. DNA ekstraktı
2. 25 mM MgCl<sub>2</sub>
3. dH<sub>2</sub>O
4. 10 mM dNTP
5. MgCl<sub>2</sub> içermeyen 10X buffer
6. Taq DNA polimeraz
7. 16S rDNA-P1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
8. 16S rDNA-P2 (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3')
9. 16S rDNA-P3 (5'-GTGTGGGTTTCCTTCCTTGG-3')
10. 16S rDNA-P4 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')

#### Yöntem:

1. Her örnek için aşağıda belirtilen miktarlarda PZT karışımı hazırlanmıştır.

dH <sub>2</sub> O	31,5 µl	(30,5 µl)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5,0 µl	
dNTP 10 mM	1,0 µl	( 2,0 µl)
10 X Buffer	5,0 µl	
Primer 1 (25 mM)	1,0 µl	
Primer 2 (25 mM)	1,0 µl	
Taq DNA polimeraz	0,5 µl	
Toplam hacim	45,0 µl	

2. Çalışılacak örnek sayısı kadar hazırlanan karışım 0.5mL'lik tüplerin her birine 45 µL dağıtılmış ve üzerlerine 5 µL DNA ekstraktı eklenmiştir.

3. Isı döngü cihazında aşağıdaki siklus programı uygulanmıştır.

95°C	10 dk.	}	45 döngü
94°C	1 dk.		
56°C (58-59)	1 dk.		
72°C	1 dk.		
72°C	10 dk.		
4°C	∞		

4. Amplifikasyon ürünü saptama basamağının uygulanacağı zamana kadar 2–8°C'de 3 gün veya -20°C de 6 ay saklanmıştır.

### 3.2.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi:

Tüberküloz dışı mikobakterilerin DNA'larından PZT ile iki parça halinde çoğaltılan 1524 bp'lik 16S rRNA geninin 1027 bp ve 714 bp'lik parçaları agaroz jel elektroforezi uygulanarak gösterilmiştir.

#### Gereçler:

1. EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) stok solüsyonu (0,5M)

2. Tris-Borik asit-EDTA (TBE 10X; Stok TBE solüsyonu)

Trizma base (Sigma T1503) 54 g

Borik asit (Sigma B6768) 27,5g

Na<sub>2</sub>EDTA (0,5M) 20 mL

450 mL distile su içerisinde eritilmiş ve soğuduktan sonra üzerine 20 ml Na<sub>2</sub>EDTA eklenerek 500 mL'ye tamamlanmıştır.

Kullanım sırasında stok TBE solüsyonu 1/10 sulandırılmış ve TBE 1X olarak kullanılmıştır.

3. Etidyum bromit solüsyonu (EtBr) (10 mg/mL)

Etidyum bromit (Sigma E8751) 1 g

Distile suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Işıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

4. Jel yükleme tamponu (Fermentas #R0629) -20 °C'de saklanmıştır.



5. 50 bp. DNA ladder, -20 °C'de saklanmıştır.

6. Agar

**Yöntem:**

1. %2' lik agaroz jel (%2' lik agaroz jel = 1.4 g agaroz, 70 mL 1 X TBE, 2.8 µL EtBr) elektroforez tankı kullanılarak dökülmüş ve katılaşması için 20 dk beklenmiştir.
2. İlk kuyucuğa standard belirleyici olarak 50 bp. DNA ladder yüklenmiştir.
3. İkinci kuyucuktan itibaren 2 µL jel yükleme tamponu ile homojen olarak karıştırılan her primer için ayrı 7 µL PZT ürünü yüklenmiştir.
4. 15 dk. 200 voltta elektroforez yapılmış ve UV transluminatör üzerinde jel fotoğraflanmıştır.

**3.2.2.7. 16S rDNA geni Dizi Analizi İçin İkinci PZT (Cycle Sequencing)**

**Gereçler:**

1. Terminator Ready Rection Mix (TRRM)
2. ddH<sub>2</sub>O
3. 16S rDNA-P1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
4. 16S rDNA-P2 (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3')
5. 16S rDNA-P3 (5'-GTGTGGGTTTCCTTCCTTGG-3')
6. 16S rDNA-P4 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')

**Yöntem:**

1. Jel elektroforezinde görüntülenen DNA ürünleri ikinci PZT için aşağıda belirtilen miktarlarda her örnek için hazırlanmıştır.

### Sens-1 ve Sens-2

TRRM*	4.0 µl	TRRM	4.0 µl
Ürün	0.5 µl (1.0)	Ürün	0.5 µl (1.0)
16S rDNA primer-1	0.5 µl (1.0)	16S rDNA primer-3	0.5 µl (1.0)
ddH <sub>2</sub> O	5.0 µl (4.0)	ddH <sub>2</sub> O	5.0 µl (4.0)
Toplam	10 µl	Toplam	10 µl

### Antisens-1 ve Antisens-2

TRRM*	4.0 µl	TRRM	4.0 µl
Ürün	0.5 µl (1.0)	Ürün	0.5 µl (1.0)
16S rDNA primer-2	0.5 µl (1.0)	16S rDNA primer-4	0.5 µl (1.0)
ddH <sub>2</sub> O	5.0 µl (4.0)	ddH <sub>2</sub> O	5.0 µl (4.0)
Toplam	10 µl	Toplam	10 µl

2. Çalışılacak örnek sayısı kadar hazırlanan karışım 0.5 mL'lik tüplerin her birine 9 µL dağıtılmış ve üzerlerine 1 µL ürün eklenmiştir.

3. Isı döngü cihazında aşağıdaki siklus programı uygulanmıştır

95 °C	5 dakika	} 30 döngü
95 °C	30 saniye	
50 °C	10 saniye	
60 °C	4 dakika	
4 °C	∞	

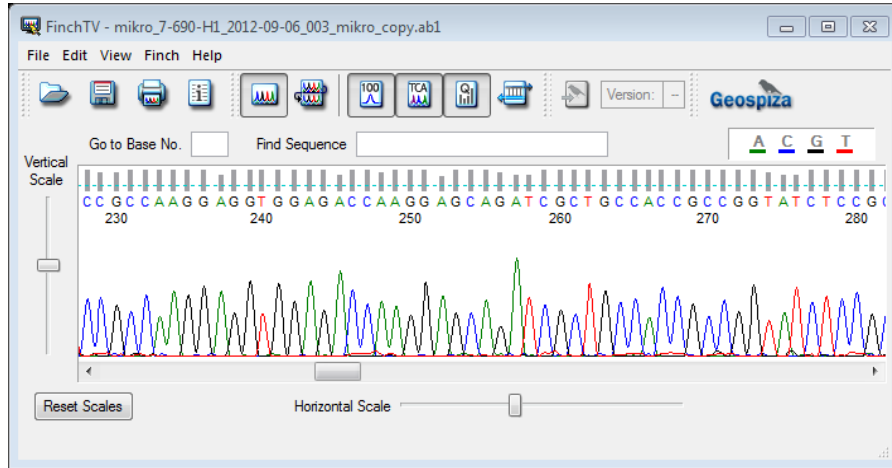
#### 3.2.2.8. Dizi Analizi Öncesi PZT Ürünlerinin Saflaştırılması

- İkinci PZT ürünleri 500 µl'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Örnek başına 30 µl etanol, 3 mol Na asetat 5 µl hazırlanmış ve bu karışımdan 30 µl PZT ürünlerine aktarılmıştır.
- Tüpler 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
- Çökelti üzerine 125 µl etanol ilave edildikten sonra tüpler vortekslenmiştir.
- Tüpler 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
- Pellet kısmında tuzlu görünüm varsa 125 µl etanol ilave edilip vortekslenerek santrifüj tekrarlanmıştır.

- 25 µl formamid ile çözülen karışım ısı bloğunda 95°C'de 2 dakika bekletilmiştir.
- Reaksiyonu durdurmak için tüpler hemen buz bloğuna aktarılmış, tüpler bekletmeden DNA dizi analizi cihazına yönlendirilmiştir.

### 3.2.2.9. Dizi Analizi ve Dizilerin değerlendirilmesi

DNA dizi analizi için otomatize DNA sekans cihazı (Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer) kullanılmıştır. Dizi analizi verileri Finch TV dizi analizi programı yardımıyla editlenmiş (düzeltilmiş) ve elde edilen diziler BLAST programı kullanılarak GenBank'daki referans dizilerle karşılaştırılmıştır.



**Şekil 3: Finch TV ile çalışmamızdaki bir suşun DNA dizi kromatogramı**

Referans dizilerle tam homoloji gösteren suşlar, referans dizinin elde edildiği tür olarak tanımlanmıştır. Elde edilen 16S rDNA dizileri ayrıca RIDOM (<http://www.ridom-rdna.de>) veri tabanında yer alan referans dizilerle de karşılaştırılmıştır. Veri tabanında yer alan hiçbir referans diziyile tam homoloji göstermeyen suşlardan elde edilen diziler kendileriyle en fazla dizi homolojisi gösteren türlerin dizileriyle birlikte Lasergene 6 (DNASar, Inc) Editseq

programında editlenmiş, MegAlign programıyla hizalanmış ve Clustal W yöntemiyle filogenetik ağaç oluşturulmuştur (45).

## IV. BULGULAR

### 4.1. TDM Suşlarına Ait Veriler

Nisan 2007- Temmuz 2011 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarında toplam 5122 örneğin kültürü yapılmıştır. Bu örneklerin 351'inde (6,85%) kültür pozitif bulunmuştur (Tablo 3). Örneklerin 126'sında (%2.46) TDM, 225'inde ise (%4.39) MTBC üremiştir.

**Tablo 3: 2007-2011 yılları arasında incelenen örneklerin kültür sonuçları**

Yıl	Kültür yapılan örnek sayısı	Kültür pozitif örnekler n (%)		
		TDM	MTBC	Toplam
<b>2007 (Nisan-Aralık)</b>	867	30 (%3.46)	42 (%4.84)	72 (%8.30)
<b>2008</b>	995	20 (%2.01)	55 (%5.53)	75 (%7.54)
<b>2009</b>	1119	9 (%0.80)	35 (%3.13)	44 (%3.93)
<b>2010</b>	1144	61 (%5.33)	61 (%5.33)	122 (%10.66)
<b>2011 (Ocak-Temmuz)</b>	997	6 (%0.60)	32 (%3.21)	38 (%3.81)
<b>TOPLAM</b>	<b>5122</b>	<b>126 (%2.46)</b>	<b>225 (%4.39)</b>	<b>351 (%6.85)</b>

Kültürde üreyen 126 TDM'nin 118'i (%93.65) solunum yolu, 8'i ise (%6.35) solunum yolu dışı örneklerden üremiştir. İzole edilen 225 MTBC suşunun ise 157'si (%69.78) solunum yolu, 68'i (%30.22) ise solunum yolu dışı örneklerden üremiştir (Tablo 4).

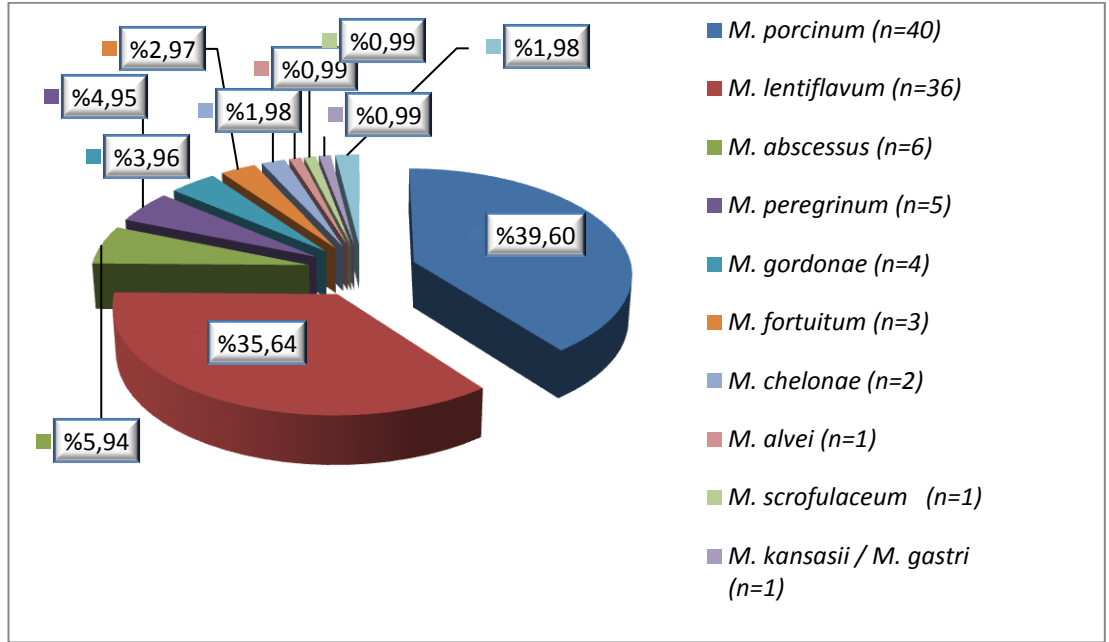
**Tablo 4. Kültürde üreyen mikobakterilerin hasta örneklerine göre dağılımı**

Hasta Örneği	Kültür pozitif örnek n (%)	MTBC n (%)	TDM n (%)
<b>Solunum yolu örneği</b>	275 (%78,35)	157 (%57,09)	118 (%42,91)
<b>Solunum yolu dışı örnek</b>	76 (%21,65)	68 (%89,47)	8 (%10,53)
<b>Toplam</b>	<b>351 (%100)</b>	<b>225 (%64.10)</b>	<b>126 (%35.90)</b>

#### 4.2. DNA dizi analizi sonuçları

Çalışmamızda Nisan 2007- Temmuz 2011 tarihleri arasında izole edilen 126 TDM suşunun 110 tanesi çalışmaya dahil edilmiş olup, PZT ve DNA dizi analizi aşamalarında ürün kayıpları nedeniyle 101 adet TDM mikobakteri tiplendirilmiştir.

Hsp65 ve 16S rDNA gen bölgeleriyle çalışılan suşların elde edildiği klinik örnekler, yıllara ve veri tabanlarına göre elde edilen sonuçları Tablo 5'te verilmiştir. DNA dizi analizi sonuçlarına göre TDM'lerin tür dağılımları Şekil 2'de verilmiştir. TDM'lerin izole edildikleri örnek türlerine göre dağılımları ise Tablo 6'da gösterilmiştir.



Şekil 4. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Tür Dağılımı (%)

**Tablo 5. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin hedef gen bölgesi ve veri tabanlarına göre dizi analiz sonuçları**

Sayı	Yıl	Örnek	hsp65	16S rDNA		Sonuç
				Blast	RIDOM	
1	2007	BAL*	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
2	2007	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
3	2007	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
4	2007	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
5	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
6	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
7	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
8	2007	Balgam	<i>M.abscessus</i> / <i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i> / <i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>
9	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
10	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
11	2007	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
12	2007	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
13	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
14	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
15	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
16	2007	Plevral sıvı	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
17	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
18	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
19	2007	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
20	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
21	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
22	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
23	2007	Balgam	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
24	2007	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
25	2007	BAL	<i>M.abscessus</i> / <i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i> / <i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>
26	2008	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
27	2008	BAL	<i>M.peregrinum</i>			<i>M.peregrinum</i>
28	2008	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
29	2008	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
30	2008	Doku	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
31	2008	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
32	2008	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
33	2008	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
34	2008	Balgam	<i>M.peregrinum</i>	?	?	?
35	2008	Balgam	<i>M.peregrinum</i>	?	?	?
36	2008	Balgam	<i>M.abscessus</i> / <i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i> / <i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>
37	2008	BAL	<i>M.alvei</i>	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M.alvei</i>	<i>M.alvei</i>
38	2008	BAL	<i>M.kansasii</i>	<i>M.kansasii</i> / <i>M.gastri</i>	<i>M.kansasii</i> / <i>M.gastri</i>	<i>M.kansasii</i>

39	2009	Balgam	<i>M.gordonae</i>	<i>M.gordonae</i>	<i>M.gordonae</i>	<i>M.gordonae</i>
40	2009	Balgam	<i>M.abscessus</i> / <i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i> / <i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>
41	2009	BAL	<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M.scrofulaceum</i>
42	2009	Balgam	<i>M.peregrinum</i>	<i>M.peregrinum</i>	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.septicum</i>	<i>M.peregrinum</i>
43	2009	AMS**	<i>M.peregrinum</i>	<i>M.peregrinum</i>	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.septicum</i>	<i>M.peregrinum</i>
44	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
45	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
46	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
47	2010	Balgam	<i>M.gordonae</i>			<i>M.gordonae</i>
48	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
49	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
50	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
51	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
52	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
53	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
54	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
55	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
56	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
57	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
58	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
59	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
60	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
61	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
62	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
63	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
64	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
65	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
66	2010	BAL	<i>M.gordonae</i>			<i>M.gordonae</i>
67	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
68	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
69	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
70	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
71	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
72	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
73	2010	BAL	<i>M.peregrinum</i> / <i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>



74	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum / M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
75	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum / M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
76	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
77	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum / M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
78	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum / M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
79	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
80	2010	Balgam	<i>M.abscessus / M.cheloniae</i>			<i>M.abscessus</i>
81	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
82	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
83	2010	Balgam	<i>M.abscessus / M.cheloniae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus / M.cheloniae</i>	<i>M.abscessus</i>
84	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
85	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
86	2010	BAL	<i>M.gordoniae</i>	<i>M.gordoniae</i>	<i>M.gordoniae</i>	<i>M.gordoniae</i>
87	2010	BAL	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
88	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum / M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
89	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
90	2010	BAL	<i>M.cheloniae</i>	<i>M.cheloniae</i>	<i>M.abscessus / M.cheloniae</i>	<i>M.cheloniae</i>
91	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
92	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
93	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
94	2010	BAL	<i>M.fortuitum</i>			<i>M.fortuitum</i>
95	2010	BAL	<i>M.peregrinum / M.porcinum</i>			<i>M.porcinum</i>
96	2011	İdrar	<i>M.fortuitum</i>			<i>M.fortuitum</i>
97	2011	Balgam	<i>M.cheloniae</i>	<i>M.cheloniae</i>	<i>M.abscessus / M.cheloniae</i>	<i>M.cheloniae</i>
98	2011	Balgam	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum / M.farcinogenes / M.senegalense</i>	<i>M.fortuitum</i>
99	2011	BAL	<i>M.peregrinum</i>			<i>M.peregrinum</i>
100	2011	Balgam	<i>M.lentiflavum</i>			<i>M.lentiflavum</i>
101	2011	Balgam	<i>M.peregrinum</i>	<i>M.peregrinum</i>	<i>M.peregrinum / M.septicum</i>	<i>M.peregrinum</i>

\*Bronkoalveoler lavaj sıvısı, \*\*Açlık Mide Sıvısı

**Tablo 6. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin örnek türüne göre dağılımı**

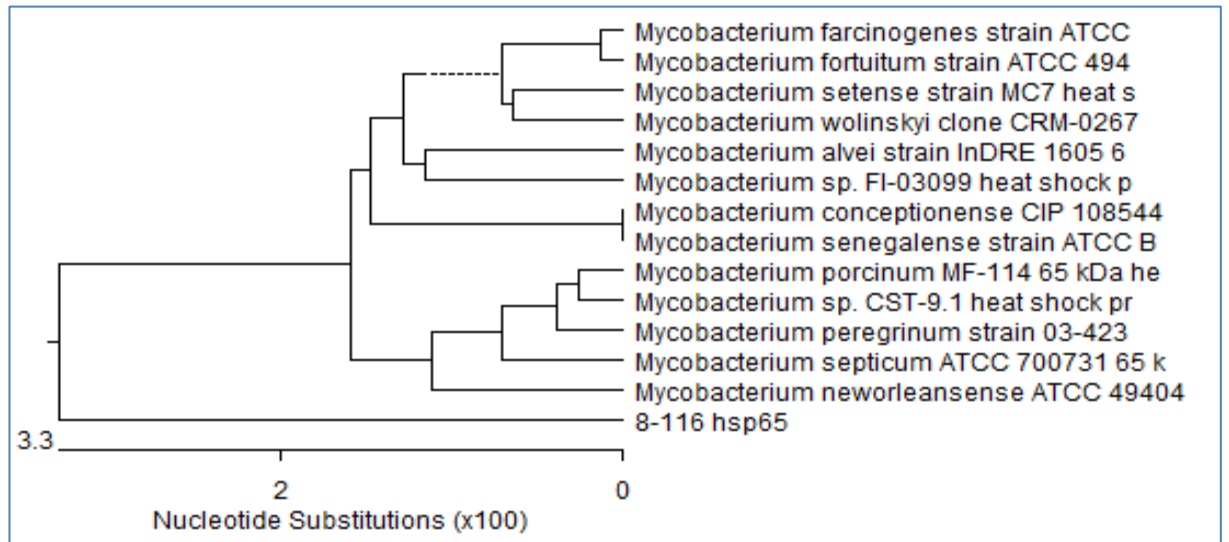
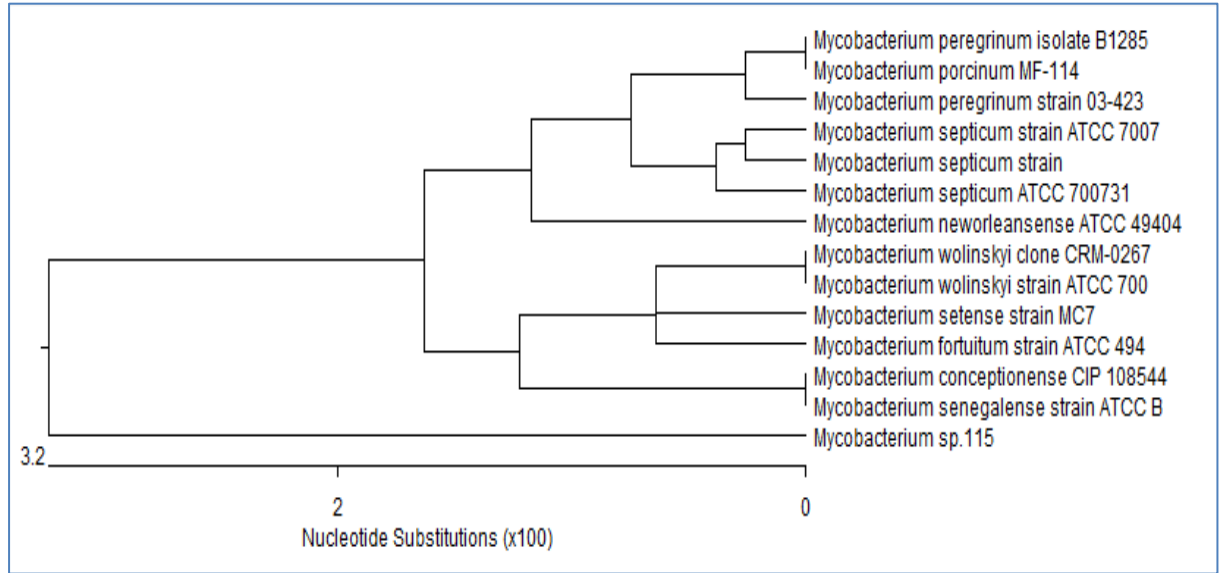
<b>Hasta örneği (n)</b>	<b>Mikobakteri türü</b>
BAL (1)	<i>M. alvei</i>
Balgam (5)	<i>M. abscessus</i>
BAL (1)	<i>M. abscessus</i>
BAL (1)	<i>M. chelonae</i>
Balgam (1)	<i>M. chelonae</i>
BAL (1)	<i>M. fortuitum</i>
Balgam (1)	<i>M. fortuitum</i>
İdrar (1)	<i>M. fortuitum</i>
BAL (2)	<i>M. gordonae</i>
Balgam (2)	<i>M. gordonae</i>
BAL (35)	<i>M. lentiflavum</i>
Balgam (1)	<i>M. lentiflavum</i>
Açlık Mide Sıvısı (1)	<i>M. peregrinum</i>
BAL (1)	<i>M. peregrinum</i>
Balgam (2)	<i>M. peregrinum</i>
BAL (1)	<i>M. peregrinum</i>
DOKU (1)	<i>M. porcinum</i>
BAL (37)	<i>M. porcinum</i>
Balgam (1)	<i>M. porcinum</i>
Plevral sıvı (1)	<i>M. porcinum</i>
BAL (1)	<i>M. scrofulaceum</i>
BAL (1)	<i>M. kansasii / M. gastri</i>
BAL (2)	TANIMLANAMADI

İzole edilen örneklerin klinik bilgilerine ulaşılamamış olup ATS kriterlerinde belirtilen; aynı hastaya ait birden fazla örnekte aynı mikobakteri türünün izole edilme kriterine dayanarak iki hastadan alınan ve balgam örneklerinde üretilen iki *M. abscessus* suşu etken olarak kabul edilmiştir. Bu suşlardan biri hastanın ardışık iki balgam örneğinde, diğeri ise bir başka hastanın ardışık üç balgam örneğinde üretilmiştir.

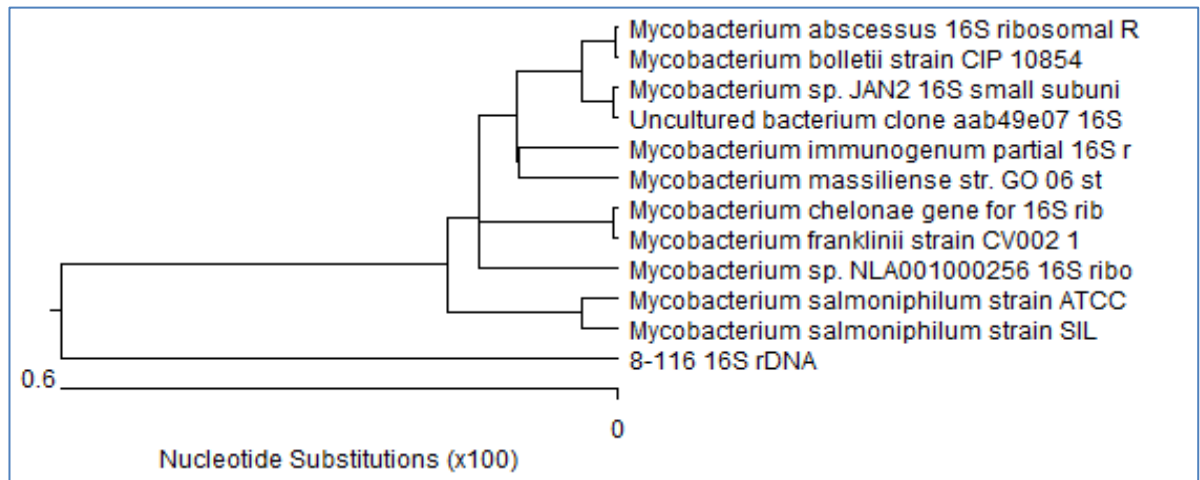
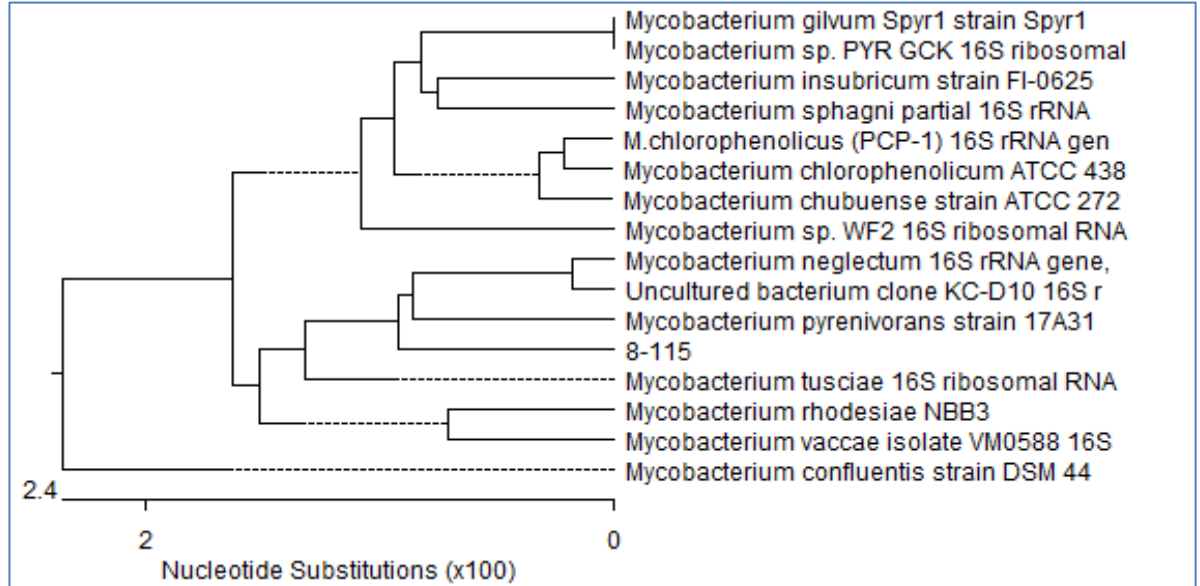
### **4.3. Tanımlanamayan suşlar**

Çalışmaya alınan iki örnek iki farklı gen bölgesiyle de veri tabanlarındaki diğer mikobakterilerle % 95-98 arasında uyumlu bulunmuş olup bu yüzdeler içerisinde veri tabanlarına aktarılan dizilerin hiçbirisiyle tam olarak örtüşmemektedir. Bu nedenle bu suşlara en yakın sonuç veren 10'un üzerinde mikobakteri; DNA dizi homolojileri Lasergene 6 (DNASStar, Inc) Editseq ve MegAlign programları yardımıyla karşılaştırılmıştır. Filogenetik ağaç ise MegAlign programında Clustal W ile oluşturulmuştur (Şema 1-4).

**Şema 1-2. Hsp65 gen bölgesiyle tanımlanamayan suşların sırasıyla filogenetik ağacı ( 8-115 ve 8-116)**



**Şema 3-4. 16S rDNA gen bölgesiyle tanımlanamayan iki suşun sırasıyla filogenetik ağacı (8-115 ve 8-116)**



## V. TARTIŞMA

Son yıllarda AIDS insidansının artması ve immunsupresif ilaç kullanımının yaygınlaşması TDM infeksiyonlarının görülme sıklığını daha da artırmıştır (21). Bu infeksiyonların önem kazanması nedeni ile TDM identifikasyonuna ve moleküler epidemiyolojisine ait çalışmalar da artış göstermiştir. Ülkemizde bu konuda yapılmış araştırmalar olmakla birlikte daha önce Manisa Bölgesinde yapılmış bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarında 2007-2011 yılları arasında izole edilen TDM'ler moleküler olarak identifiye edilmiştir. Bu tarihler arasında tüberküloz ön tanısı ile gönderilen 5122 örneğin 126'sında (%2.46) TDM üretilmiştir. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarında yapılan benzer bir tez çalışmasında 2004-2010 yılları arasında örneklerin %1.2'sinde TDM üretilmiştir (47). Ülkemizde değişik bölgelerden bildirilen çalışmalar da vardır. Konya'da Kurtoğlu ve ark.ları tarafından yapılan bir araştırmada 1670 örneğin 10 tanesinde (%0.6) TDM izole edilmiştir (48). Gaziantep'de Zer ve ark.ları ise 3831 örneğin sadece 3'ünde (%0.1) TDM ürediğini bildirmişlerdir (49). İstanbul'da ve Ankara'da yapılan iki farklı araştırmada fenotipik yöntemler kullanılarak TDM identifikasyonu yapılmış, kültürde üreyen TDM mikobakteri oranları sırasıyla %1.9 ve %7.1 olarak bildirilmiştir (30,50). Elde edilen farklı sonuçlar ülkemizde TDM'lerin dağılımındaki farklılıklara bağlı olabileceği gibi, mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kullanılan işleme, kültür ve identifikasyon yöntemlerindeki farklılıklara da bağlı olabilir. Ayrıca mikobakteriyoloji laboratuvarlarının kültür pozitiflik oranlarının bilinmesi de önemlidir. Aynı zamanda klinik örneklerin hangi koşullarda gönderildiği sorgulanmalıdır. Bu çalışmada toplam 2007 Nisan - 2011 Temmuz yılları arasında izole edilen toplam 126 TDM suşun 101 tanesi altın standart yöntem olan dizi analizi ile tanımlanmıştır. Bu yüksek örnekleme ait

sonuçların bölgemizde bulunan TDM'ler hakkında değerli bilgi verdiği kanısındayız.

TDM infeksiyonlarının tanısına ve epidemiyolojisine ait çalışmalarda karşılaşılan en önemli sorunlardan biri TDM'lerin çevresel ortamda bulunabilmesi ve hasta örneklerine çevreden bulaşabilmesidir. TDM'lerin yaşam alanları içinde en önemlileri hastane su sistemleri, içme suyu dağıtım sistemleri ve ev boru tesisatlarıdır. Son yıllarda TDM'lerden kaynaklanan hastane infeksiyonlarının sayısının gittikçe arttığı da belirtilmiştir (21, 51, 52). Grubek-Jaworska ve ark.ları 1999-2005 yılları arasında inceledikleri 4192 hasta örneğinin 445'inde mikobakteri varlığı tespit etmişler; bunlardan 142'sinin *M. tuberculosis*, 303'ünün ise TDM olduğunu belirlemişler ve TDM izolatlarının %9'unu akciğer infeksiyonu etkeni, diğerlerini (%91) ise çevresel kontaminant veya kolonizasyon olarak değerlendirmişlerdir (53). Moghim ve ark.ları değişik kaynaklardan aldıkları 85 su örneğinin %25'inde kültür ve moleküler identifikasyon yöntemleri kullanarak TDM bulunduğunu göstermişlerdir (54). Shin ve ark.ları ise hastane musluk sularının yarısında TDM saptamışlardır (55).

Bu çalışmada hastaların klinik ve histopatolojik verilerine ulaşamadığından çalışılan suşların etken veya kontaminasyon ayırımını yapmak mümkün olmamıştır. DNA dizi analizi sonuçlarına göre çalışılan suşların %39'u *M. porcinum*, %35'i ise *M. lentiflavum* olarak tanımlanmıştır. Laboratuvarımızda izole edilen TDM suşlarının %75'inin iki türe ait olması ve bu bakterilerin çoğunluğunun BAL örneklerinden izole edilmesi hastane su sistemleri ve cihaz yıkama sıvılarına bağlı olası kontaminasyonu düşündürmektedir. Ülkemizde bu yönde çalışmaların artması ile kontaminasyon oranları hakkında daha net bilgilere ulaşılabileceği kanısındayız.

Çalışmamızda, identifikasyonu yapılan üç balgam örneğinden (%2.9) izole edilen *M. abscessus* suşunun ATS kriterlerine göre infeksiyon etkeni olabileceği kabul edilmiştir. İdentifiye edilen diğer 98 (%97.03) suşun etken olduğu kanıtlanamamış ve kontaminasyon kaynaklı olarak değerlendirilmiştir.

Kontaminant olarak kabul edilen 98 örneğin %85.7'i BAL, %10.2'u balgam örnekleridir. Bu veriler ATS'nin mikrobiyoloji etken kabul etme kriterlerinde yer alan "en az bir bronkoalveoler lavaj (BAL) veya bronş yıkama örneğinde kültürde TDM üremesi" maddesiyle tezat oluşturmaktadır. Bu çelişki yukarıda değinildiği üzere hastane su dağıtım sistemlerinin kontrolünü ve cerrahi veya klinik araştırmalarda kullanılan ekipmanların doğru sterilizasyon veya dezenfeksiyonunun sorgulanması gerektiğini göstermektedir. Solunum yolu örneklerinden izole edilen mikobakteriler içinde TDM oranları 2008 yılında %27.78, 2009 yılında %23.53 ve 2010 yılında %57.55'tir. 2010 yılında görölen bu yüksek TDM oranı aynı yıl hastanemizde otomatize bronkoskop yıkama cihazının kullanılmaya başlanması ile paralellik göstermektedir. Bu nedenle yüksek kontaminasyon oranlarına dikkat edilmeli, özellikle bronkoskopi yıkama solusyonları ve endoskopların yeterli ve uygun koşullarda dekontaminasyonu sorgulanmalıdır.

Tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler zahmetli olup uzun zaman gerektirmekte ve sadece belli türleri birbirinden ayırt edebilmektedir. Aynı zamanda yeni mikobakteri türlerinin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadırlar (42). Son yıllarda mikobakteriyel infeksiyonların tanısında moleküler yöntemler büyük önem kazanmıştır (42). Mikobakteri saptanması ve identifikasyonunda kullanılan moleküler teknikler; nükleik asit problemleri, konvansiyonel PZT, türe spesifik problemlerle PZT hibridizasyonu, PCR RFLP analizi ve dizi analizidir. Mikobakterilerin tanımlanmasında dizi analizi için en sık kullanılan gen bölgeleri, 16S rRNA, hsp65, *gyrB*, *rpoB*, *secA* ve internal transcribed spacer (ITS)'dir. Ancak hangi gen bölgesinin identifikasyonda ayırımı daha iyi yaptığı henüz kesinlik kazanmamıştır (56). Tür tayininde kullanılabilmesi için gen bölgesinin türler arasında yeterli farklılıklar içermesi ancak aynı türden suşlarda çok az ya da hiç varyasyon göstermemesi gerekir. Çok fazla tür içi varyasyon içeren genler tür tayini için uygun değillerdir. Eğer bir hedef gende türler arası varyasyon çok az ise tür tayini güçleşir, tür içi varyasyon çok fazla



ise uyumsuz bölgeler artacağından tanımlama yapılamaz. Sık rastlanmayan türlerde ve zor taksonomik gruplarda ikinci bir hedef gen bölgesi de taranabilir (56). Araştırmacılar eğer grup düzeyinde ayırım yeterli ise 16S rRNA geninin uygun olduğunu, alt tür düzeyinde ayırım gerektiğinde doğru identifikasyon için iki genin kombine edilerek çalışılmasını önermektedir (57). Bütün mikobakteri türlerinde bulunan *hsp65* geni, 16S rDNA dizisinden daha fazla değişkendir ve *M. tuberculosis* kompleks üyeleri hariç klinik olarak önemli bütün mikobakterileri ayırt edebilecek yeterli ölçüde dizi farklılıkları içermektedir. Bu nedenle genetik olarak ilişkili türlerin tanımlaması için yararlı olabilir. Bu bölge tür içerisinde de değişkenlik gösterebilmektedir, bu nedenle belirli mikobakteri türlerinin klonlarının ayırt edilmesinde de kullanılmaktadır (58). Hsp65 geninin 16S rDNA dizi analizine üstünlüğü, daha fazla farklılık içermesi ve 401 nükleotitten daha büyük bir kısmın dizisine ihtiyaç duyulmamasıdır.

Bizim çalışmamızda da 16S rDNA genine ek olarak *hsp65* geni ile DNA dizi analizi yapılmıştır. Çalışmamızda *hsp65* geni ile *M.peregrinum*-*M. porcinum* kompleks ve *M. abscessus/chelonae* ayrımı yapılamamıştır. *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. lentiflavum*, *M. alvei*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* BLAST programı kullanılarak GenBank'daki referans dizilerle karşılaştırılmış elde edilen dizilerle tam homoloji göstermiştir. Aynı suşlar 16S rDNA geniyle yapılan dizilerde *hsp65* sonuçları *M. peregrinum*-*M. porcinum* çıkan 40 suş *M. porcinum*, *M. abscessus/chelonae* olarak sonuçlanan altı suş *M. abscessus* olarak referans diziyile tam homoloji göstermiştir. Bu çalışmada iki farklı gen bölgesiyle çalışılması tek gen bölgesiyle çalışıldığında elde edilecek olumsuzlukları ortadan kaldırmıştır.

Dizi analizi yöntemlerinde, elde edilen bakteri dizilerinin bilgisayar ortamında karşılaştırılması gereken standart dizilere ihtiyaç vardır. Bu amaçla kurulmuş standart dizi analizi servisleri mevcuttur. Dizi analizi için kullanılacak GenBank, RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical

Microsystems database) EMBL (European Molecular Microbiology Laboratory) gibi çeşitli veri tabanları internet aracılığı ile kullanılabilir. Bu servislerden biri olan RIDOM, web tabanı üzerinde dizi analizi yanısıra fenotipik ve genotipik özellikleri de sunmaktadır (42). Araştırmacılar, laboratuvarlarında saptadıkları dizileri bu serviste yayınlamaktadırlar. RIDOM'da en son mikobakterilerin dizi verileri de eklenmektedir. RIDOM merkezli bir araştırmada araştırmacılar daha önce ki mevcut dizi veri tabanları ve analitik gereçlerin (ör: National Center for Biotechnology Information [NCBI], GenBank ve Ribosomal Database Project [RDP]) mikroorganizmaların doğru identifikasyonu için optimal olmadıklarını iddia etmiştir (59). Bu veri tabanlarının içeriklerindeki sorunları; 1) Dizi sonlarının ragged olması (yanlış eşleşmelere neden olabilir) 2) Yanlış dizilerin eklenmiş olması (önceleri kullanılan tekniklerin hataya açık olması nedeniyle, ör: ters transkriptaz dizileme) 3) Dizilerin kalite kontrolünün olmayışı 4) Klinik önem taşıyan bazı mikroorganizmaların dizilerini içermemeleri olarak özetlemiştir. RIDOM projesinin bu sorunların üstesinden gelmek için çaba sarf ettiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar mikobakteri kültürlerinden toplamda 199 adet kısmi 16S rRNA dizilerini ve 84 adet ITS dizilerini kaliteli bir veri tabanı oluşturmak amacıyla hazırlamış ve bunlardan geçerli olarak tanımlanan 89 tür ve alt türü veritabanına eklemiştir. RIDOM ve GenBank mikobakteriyel 16S rDNA dizileri karşılaştırılmış, iki veri tabanında en az %80 benzerlik olduğu saptanmıştır (59). Bir başka çalışmada 92 mikobakteri türü içeren 121 American Type Culture Collection (ATCC) suşunun >1400 bp'lik 16S rRNA dizileri elde edilmiş ve Gen- Bank, EMBL, DDBJ ve RIDOM veritabanlarıyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca 122 klinik TDM suşunun neredeyse tamamının 16S rRNA gen dizileri elde edilmiş ve kendi dizileri ve RIDOM veritabanı (yaklaşık 440 bp) ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar 122 klinik suşun 61'i veritabanındaki bilinen türlerle %100 uyumlu, 19 tanesi bazı farklar olsa da bilinen türlerle uyumlu, 11 tanesi türü belirlenmemiş dizilerle uyumlu, 31 tanesinin ise veritabanında benzeri olmadığı görülmüş, yeni suşlar olarak

saptanmıştır. 16S rRNA dizi analizinde türler arası benzerliğin en düşük olduğu türlerin *M. xenopi* ve *M. chelonae* olduğu, tür içi benzerliğin ise % 93'ün üzerinde olduğu bildirilmiştir (60).

Bu çalışmada da 16S rDNA geniyle incelenen suşların dizi analizi GenBank ve RIDOM veri tabanlarıyla karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, *M. lentiflavum*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum* için her iki veri tabanı ile uyumlu bulunmuştur. GenBank BLAST veri tabanı ile *M. peregrinum* %100 benzerlikle saptanırken, RIDOM veri tabanında *M. peregrinum*/*M. septicum* ayırt edilememiştir. *M. abscessus* ve *M. chelonae* için de GenBank BLAST veri tabanı ile %100 homolojide dizi karşılığı varken, RIDOM veri tabanında *M. abscessus*/*M. chelonae* olarak sonuçlanmıştır. *M. fortuitum* BLAST veri tabanında %100 uyumlu iken, RIDOM veri tabanında *M. fortuitum*/*M. farcinogenes*/*M. senegalense* çıkmıştır. *M. porcinum* BLAST veri tabanında %100 benzerlikle saptanırken RIDOM sonuç diziyi *M. porcinum*/*M. fortuitum* kompleks olarak vermiştir. Hsp65 gen bölgesiyle *M. kansasii* çıkan bir suş her iki veri tabanında *M. kansasii*/*M. gastri* olarak neticelenmiştir. Bu veriler 2007 yılında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Mikobakteri Referans Laboratuvarlarında aynı yöntemle elde edilen DNA dizi analizi verileriyle örtüşmektedir (61). Bu veriler RIDOM veri tabanının 16S rDNA gen bölgesinde veri tabanının klasifikasyonunda başarılı, veri tabanının güvenilir olduğunu göstermiş, ancak yeterli güncellemelerin olmadığı kanısına varılmıştır. GenBank BLAST veri tabanının ise çok daha güncel dizilerin olduğu, ancak veri tabanının güvenilirlik ve denetimi konusunda yetersiz olduğunu düşündürmektedir.

Mikobakteri türlerinin DNA dizi analizi ile adlandırılabilmesi için türlerin farklı oranlarda evrimleştikleri göz önüne alındığında evrensel bir eşik değeri belirlemek imkansızdır. Ancak Drancourt ve ark. çalışmalarında tür ve cins tanımlamada eşik değer olarak sırasıyla %99 ve %97 benzerlik oranlarını kullanmışlardır (62). Janda ve ark.ları rehberlerinde tür düzeyinde tanımlamada eşik değer olarak en az %99, idealde %99.5 benzerliğin

aranmasını önermişlerdir (63). Bizim çalışmamızda da tanımlanamayan iki tür dışında %100 homolojide diziler elde edilmiştir.

Çavuşoğlu ve ark.ları tarafından 16S rDNA dizi analizi, DNA-DNA hibridizasyonu ve protein kodlayan genlerin (housekeeping) dizi analizi yeni bir tür tanımlanırken kullanılan moleküler kriterler olarak belirtilmiştir (45). Araştırmacılar 16S rDNA dizi analizi ile birlikte RNA polimeraz enziminin beta alt ünitesini kodlayan *rpoB* geni gibi protein kodlayan bir genin dizi analizinin yapılmasıyla daha güvenilir sonuçlar alındığını bildirmişlerdir. Araştırmacılara göre DNA-DNA hibridizasyonu ile aynı tür içinde DNA ilişkisinin en az %70, farklılığın ise %5'in altında olması istenmektedir. Bununla birlikte farklı türler arasında olması gereken en az dizi farklılığını %0.5, %1 veya %1.5 olarak kabul eden gruplar da bulunmaktadır (45, 64, 65). Çalışmamızda iki suşun hem *hsp65* hem de 16S rDNA gen bölgesiyle dizi analizi sonucu %95-98 oranında mevcut dizilerle uyumlu bulunmuştur. Bu yüzdeler içerisinde veri tabanlarına aktarılan dizilerin hiçbiriyle tam olarak örtüşmemektedir. Bu nedenle bu suşlara en yakın sonuç veren 10'un üzerinde mikobakterinin DNA dizi homolojileri girilerek filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu suşlara yönelik yeni bir mikobakteri türü tanımlanabilmesi için klinik ve biyokimyasal verilerinin açığa çıkarılıp fenotipik özelliklerinin ortaya konması yeni bir araştırma konusu olmaya adaydır.

Çalışmamızda DNA dizi analizi ile elde edilen sonuçlara göre 101 adet TDM suşunun tür dağılımı %39.60 *M. porcinum*, %35.64 *M. lentiflavum*, %5.64 *M. abscessus*, %4.95 *M. peregrinum*, %3.96 *M. gordonae*, %2.97 *M. fortuitum*, %1.98 *M. chelonae* ve %0.99 oranlarında *M. alvei*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*-*M. gastri* olarak belirlenmiştir. 2007 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikobakteri Laboratuvarı ve Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Mikobakteri Referans Laboratuvar'larında bizim çalışmamızla aynı yöntemle 16S rRNA ve *hsp65* gen bölgelerinden elde edilen DNA dizi verilerinin ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilmesi sonucunda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 59 TDM

türünün 18'i (%30.5), *M. gordonae*, sekizi (%13.6) *M. fortuitum*, altısı (%10.2) *M. kumamotoense*, beşer tanesi (%8.5) *M. neoaurum*, *M. lentiflavum*, *M. intracellulare* ve ikisi (%3.4) *M. peregrinum* olarak tanımlanırken, *M. elephantis*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. terrae*, *M. xenopi* yalnızca birer tür (%1,7) olarak saptanmıştır (61).

2011 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesinde PRA hsp65 yöntemiyle solunum yolu örneklerinde saptanan TDM'lerin tür dağılımında en sık *M. abscessus* tip 1 (69 suş), *M. xenopi* (26), *M. fortuitum* (14), *M. peregrinum* tip 2 (14) bulunmuştur (47). Tanımlanan diğer mikobakteri türleri ise, *M. porcinum* tip 1, *M. septicum* tip 1, *M. simiae* tip 5, *M. lentiflavum* tip 1, *M. florentinum* tip 1, *M. intracellulare* tip 1, *M. chimaera* tip 1, *M. genavense* tip 2, *M. simiae* tip 1, *M. chelonae*, *M. novocastrense*, *M. gordonae* tip 6, *M. colombiense* tip 1, *M. avium s. avium* tip 2, *M. massiliense* tip 1, *M. bolletii* tip 1, *M. abscessus* tip 2, *M. avium s. avium* tip1, *M. avium s. paratuberculosis* tip 1, *M. avium s. silvaticum* tip 1 olarak bildirilmiştir (47).

Biçmen ve ark.larının 2004-2009 yılları arasında yaptığı çalışmada, klinik olarak tüberküloz şüpheli 77 hastadan alınan 208 örnekte TDM izole edilmiştir (7). Bunlardan 31 suşun (%0.16) ATS kriterlerine göre infeksiyon etkeni olduğu saptanmıştır. Bu 31 suşun tür dağılımı; *M. gordonae* (%22.1), *M. avium* kompleks (%20.8), *M. fortuitum-peregrinum* kompleks (%14.3), *M. abscessus* (%9.1), *M. kansasii* (%9.1), *M. simiae* (%7.8), *M. szulgai/intermedium* (%3.9), *M. chelonae* kompleks (%3.9), *M. scrofulaceum* (%2.6) ve *M. lentiflavum* (%2.6) olarak saptanmıştır. Laboratuvar veya çevresel kontaminant olarak bildirilen türler ise *M. gordonae*, *M. avium* kompleks, *M. fortuitum-peregrinum* kompleks, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. chelonae* kompleks, *M. szulgai/intermedium*, *M. scrofulaceum* ve *M. lentiflavum*'dur.

Albayrak ve ark.larının Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında 2009-2010 yıllarında TDM'lerin dağılımlarının irdelendiği çalışmasında TDM suşları arasında *M. fortuitum* (%33) en sık izole edilen tür olmuş, bunu *M.*

*abscessus* (%18), *M. gordonae* (%10) ve *M. avium* (%8) izlemiştir (6). Ayrıca *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. celatum*, *M. haemophilum*, *M. smegmatis* ve *M. xenopi* tanımlanan diğer TDM türleri olmuştur. Ayrıca, en sık izole edilen tür olan *M. fortuitum* suşlarının çoğunun perifer tüberküloz laboratuvarlarından gönderilen örneklerde tespit edildiği vurgulanmıştır.

2013 yılında İstanbul'da iki hastanenin farklı departmanlarından alınan toplam 160 sıcak ve soğuk su örneğinde TDM araştırılmış, örneklerin 33 tanesinde (%20.6) TDM saptanmıştır (66). TDM'lerin %60'ı *M. lentiflavum*, %30'u *M. gordonae* ve %10'u *M. peregrinum* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada en sık, bizim çalışmamızda ikinci sıklıkta saptanan tür olan *M. lentiflavum* ilk kez 1996'da tanımlanmıştır (67). *M. lentiflavum* antibiyotiklere çoklu direnç gösteren bir türdür, insanları infekte edebilir, HIV (+) lere hastalık yapabilir. Ülkemizden bu türün etken olduğu herhangi bir infeksiyon bildirilmemiş ancak *M. lentiflavum*'un immunsuprese hastalarda etken olabileceği, birçok anti tüberküloz ilaca invitro dirençli olduğundan, etken olduğunda tedavinin zor olabileceği, bu nedenle göz ardı edilmemesi gerektiği unutulmamalıdır. (68, 69).

Bizim çalışmamızda, diğer çalışmalardan farklı olarak en sık izole edilen *M. porcinum* hızlı üreyen bir mikobakteridir. İlk kez 1973 yılında TB benzeri infeksiyonu olan bir domuzun lenf nodlarından izole edilmiştir (70). 1983'te karakterize edilmiş ve ATCC suşu olarak tanımlanmıştır (ATCC 33726). *M. fortuitum*'dan D-mannitol ve i-myo-inositol pozitifliği, nitrat negatifliği, suksinamidaz pozitifliği ve amonyak varlığında benzoatı karbon kaynağı olarak kullanabilmesi ile ayrılmıştır (70). *M. fortuitum*'un sorbitol negatif 3. biovaryant kompleksinden moleküler yöntemlerle ayrılmasıyla 2004'te ilk kez insan patojeni olarak saptanmıştır (71). *M. porcinum* yara infeksiyonları, intravasküler kateter ilişkili infeksiyonlar, osteomyelit gibi tablolara yol açabilmektedir (71).

Sonuç olarak, laboratuvarımızda en sık olarak tespit edilen TDM tür dağılımı ülkemizin değişik bölgelerinden bildirilen çalışmalara göre kısmen farklılık göstermektedir. Çalışmamızda en sık izole edilen iki tür olan *M. lentiflavum* ve *M. porcinum*'un antibiyotiklere direnç göstermesi ve insan infeksiyonları ile ilişkili olduklarının bilinmesi nedeni ile dikkate alınmaları gerekmektedir. Hastalara ait klinik verilerin olmaması nedeni ile izole edilen TDM'lerin etken veya kontaminant olduklarının ayırt edilememesi kısıtlayıcı olmakla birlikte, çevresel mikobakterilerin çeşitli infeksiyonlara yol açtığı bilindiğinden, elde edilen verilerin bölgemizdeki TDM infeksiyonlarının epidemiyolojisine katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Aynı zamanda TDM izolasyon oranlarının ve tür dağılımının izlenmesi hastane su sistemlerinin kontaminasyonu veya bronkoskop gibi cihazların yetersiz sterilizasyonu konusunda uyarıcı olmaktadır. Bu nedenle mikobakteriyoloji laboratuvarlarında TDM identifikasyonu rutin olarak yapılmalı ve sonuçlar yorumlanarak izlenmelidir. DNA dizi analizi yöntemi ile verilerin değerlendirilmesinde bazı sorunlar yaşanmakla birlikte bu çalışmada 16S rDNA dizi analizi ile birlikte hsp65 gen bölgesi de analiz edilerek 101 TDM suşundan 99'u başarı ile tanımlanmıştır. TDM identifikasyonunda iki gen bölgesinin çalışılması sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır. Altın standart olarak kabul edilen 16S rDNA gen bölgesinin dizi analiziyle tanımlamada yetersiz kalındığında suşların tanımlanması için hsp65 gen bölgesi ile çalışılması önerilebilir

## VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, laboratuvarımızda en sık olarak tespit edilen TDM tür dağılımı ülkemizin değişik bölgelerinden bildirilen çalışmalara göre kısmen farklılık göstermektedir. Çalışmamızda en sık izole edilen iki tür olan *M. lentiflavum* ve *M. porcinum*'un antibiyotiklere direnç göstermesi ve insan infeksiyonları ile ilişkili olduklarının bilinmesi nedeni ile dikkate alınmaları gerekmektedir. Hastalara ait klinik verilerin olmaması nedeni ile izole edilen TDM'lerin etken veya kontaminant olduklarının ayırt edilememesi kısıtlayıcı olmakla birlikte, çevresel mikobakterilerin çeşitli infeksiyonlara yol açtığı bilindiğinden, elde edilen verilerin bölgemizdeki TDM infeksiyonlarının epidemiyolojisine katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Aynı zamanda TDM izolasyon oranlarının ve tür dağılımının izlenmesi hastane su sistemlerinin kontaminasyonu veya bronkoskop gibi cihazların yetersiz sterilizasyonu konusunda uyarıcı bilgiler verebilmektedir. Bu nedenle mikobakteriyoloji laboratuvarlarında TDM identifikasyonu rutin olarak yapılmalı ve sonuçlar yorumlanarak izlenmelidir.

TDM tanısında hızlı ve güvenilir sonuç veren moleküler yöntemlerin kullanımı ve bu yöntemlerle adı konamamış mikobakterilerin ileri düzey moleküler yöntemlerden DNA dizi analizi ile tayini tercih edilmektedir. DNA dizi analizi yöntemi ile verilerin değerlendirilmesinde bazı sorunlar yaşanmakla birlikte bu çalışmada 16S rDNA dizi analizi ile birlikte hsp65 gen bölgesi de analiz edilerek 101 TDM suşunun 99'u başarı ile tanımlanmıştır. TDM identifikasyonunda iki gen bölgesinin çalışılması sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır. Altın standart olarak kabul edilen 16S rDNA gen bölgesinin dizi analiziyle tanımlamada yetersiz kalındığında suşların tanımlanması için hsp65 gen bölgesi ile çalışılması önerilebilir.



## VII. ÖZET

Çalışmanın amacı Celal Bayar Üniversitesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden soyutlanan Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin (TDM) hsp65 ve 16S rDNA gen bölgeleri hedef alınarak altın standart yöntem olan DNA dizi analizi ile identifikasyonunun yapılması ve elde edilen verilerin epidemiyolojik yönden tartışılmasıdır.

2007-2011 yılları arasında tüberküloz ön tanısı ile gönderilen 5122 örneğin 126'sında (%2.46) TDM üretilmiş ve bu suşlardan 101'i DNA dizi analizi ile çalışılmıştır. DNA dizi analizi sonuçları RIDOM ve GenBLAST veri tabanları kullanılarak değerlendirilmiş ve sıklık sırası ile *M. porcinum* (%39.60), *M. lentiflavum* (%35.64), *M. abscessus* (%5.64), *M. peregrinum* (%4.95), *M. gordonae* (%3.96), *M. fortuitum* (%2.97), *M. chelonae* (%1.98), *M. alvei* (%0.99), *M. scrofulaceum* (%0.99) ve *M. kansasii*-*M. gastri* (%0.99) türleri tanımlanmıştır. İki suş ise veri tabanlarındaki diğer mikobakterilerle %95-98 arasında uyumlu bulunmuş olup, kesin olarak tanımlanamamıştır. Çalışılan 98 suşun etken olduğu kanıtlanamamış, üç *M. abscessus* suşu ise etken olarak kabul edilmiştir.

Sonuç olarak 16S rDNA dizi analizi ile birlikte hsp65 gen bölgesi de analiz edilerek 101 TDM suşunun 99'u başarı ile tanımlanmıştır. Laboratuvarımızda en sık olarak tespit edilen TDM tür dağılımı ülkemizin değişik bölgelerinden bildirilen çalışmalara göre kısmen farklılık göstermektedir. Çalışmamızda en sık izole edilen iki tür olan *M. lentiflavum* ve *M. porcinum*'un antibiyotiklere direnç göstermesi ve insan infeksiyonları ile ilişkili olduklarının bilinmesi nedeni ile dikkate alınmaları gerekmektedir. TDM'lerin etken veya kontaminant oldukları ayırt edilememesi kısıtlayıcı olmakla birlikte, çevresel mikobakterilerin hastane infeksiyonlarına yol açabildiği bilindiğinden, elde edilen verilerin bölgemizdeki TDM infeksiyonlarının epidemiyolojisine ait bilgilere katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Tüberküloz Dışı Mikobakteri, identifikasyon, DNA dizi analizi, epidemiyoloji

## VII. ABSTRACT

The aim of the study was to perform identification of non-tuberculous mycobacteria (NTM) isolated from different clinical specimens in the Mycobacteriology Laboratory of Celal Bayar University by using the DNA sequence analysis, which remains the gold standard method, and by targeting hsp65 and 16S rDNA gene regions, and also discuss the epidemiological aspects of the data obtained.

Out of 5122 clinical specimens that have been sent to the laboratory with the initial diagnosis of tuberculosis in the period 2007-2011, NTM was identified in 126 (2.46%), and DNA sequence analysis was performed on 101 of these strains. DNA sequence analysis data was evaluated using RIDOM and GenBLAST data bases and consequently, *M. porcinum* (39.60%), *M. lentiflavum* (35.64%), *M. abscessus* (5.64%), *M. peregrinum* (4.95%), *M. gordonae* (3.96%), *M. fortuitum* (2.97%), *M. chelonae* (1.98%), *M. alvei* (0.99%), *M. scrofulaceum* (0.99%) and *M. kansasii*-*M. gastritis* (0.99%) species were characterized, respectively. Another two strains could not be identified with certainty, although they were both 95-98% compatible with other mycobacteria in the data bases. The other 98 strains examined could not be proven as a cause of the disease, whereas three *M. abscessus* strains were considered as the cause of the disease.

As a result, 99 of 101 NTM strains were successfully identified with the hsp65 gene sequence analysis in addition to 16S rDNA analysis. Distribution of most common NTM strains identified in our laboratory was slightly different according to the regions of our country. The two species most frequently isolated in our study were *M. lentiflavum* and *M. porcinum* and should be seriously considered due to their known correlation with human infections and antibiotic resistance. The isolated NTM strains could not be distinguished as the cause of the disease or a contaminant, which is the limiting factor in this study. However, considering the environmental mycobacteria may lead

to hospital infections, the data obtained in this study can contribute to epidemiological data pool of NTM infections.

**Key words:** Non-tuberculous mycobacteria, identification, DNA sequence analysis, epidemiology

## IX. KAYNAKLAR

1. Couto I, Machado D, Viveiros M, et al. Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a 3-year study. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 1161-1164.
2. Wu TL, Chia JH, Kuo AJ, et al. Rapid identification of mycobacteria from smear positive sputum samples by nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 2008; 46: 3591-3594.
3. Williams KJ, Ling CL, Jenkins C, et al. A paradigm for the molecular identification of *Mycobacterium* species in a routine diagnostic laboratory. J Med Microbiol 2007; 56: 598-602.
4. Wang H, Yue J, Han M, et al. Rapid method for identification of six common species of mycobacteria based on multiplex SNP analysis. J Clin Microbiol 2010; 48: 247-250.
5. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Bliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175: 367-416.
6. Albayrak N, Şimşek H, Sezen F ve ark. Ulusal tüberküloz referans laboratuarında 2009-2010 yıllarında tespit edilen tüberküloz dışı mikobakterilerin dağılımlarının irdelenmesi. Mikrobiyol Bul 2012; 46: 560-567.
7. Bicmen C, Coskun M, Gunduz AT, et al. Nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: causative agent or not? New Microbiol 2010; 33: 399-403.

8. Cook JL. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *Br Med Bull* 2010; 96: 45-59.
9. Daniel TM, Bates JH, Downes KA. History of Tuberculosis. In "Tuberculosis" (Ed. Bloom BR), American Society For Microbiology, Washington DC, 1994; 13-23.
10. Kocagöz T. Mikobakteri türlerinin genel özellikleri. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (Ed. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M), 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; 2277-2311.
11. Huard RC, Fabre M, Haas P, et al. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J Bacteriol* 2006; 188: 4271-4287.
12. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington DC.
13. Billinger ME, Prevots DR, Olivier KN, et al. Nontuberculous mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998-2005. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1562-1569.
14. Yüce A. Nontuberküloz Mikobakteri İnfeksiyonları: Neredeyiz? Olgularla Klinik Tablolar ve Tedavi. 15. Türk Klinik Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı (Ed. Akhan S), 23-27 Mart 2011, s 169-171.
15. Currie CS, Williams BG, Cheng RC, et al. Tuberculosis epidemics driven by HIV: is prevention better than cure? *AIDS*. 2003;17: 2501-2508.

16. Özkara Ş. Klinisyenler için tüberküloz kılavuzu. Tüberküloz epidemiyolojisi, 1.baskı. Ankara: Nobel Tıp kitabevleri, 2002; 97-125.
17. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24: 711-20.
18. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: WHO Report 2011. (WHO/HTM/TB/2011.16) Switzerland: 2011
19. Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Türkiye’de Verem Savaşı, 2011 Raporu. Ankara, 2011.
20. Öz Y, Aslan M, Akşit F ve ark., *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının değerlendirilmesi. ANKEM Derg 2012; 26: 20-24.
21. Uzun M. Non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonlarının epidemiyolojisi. 15. Türk Klinik Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı (Ed. Akhan S), 23-27 Mart 2011, s 159-161.
22. Tabarsi P, Mansouri D, Baghaei P, et al. Nontuberculoous mycobacteria among patients who are suspected for multidrug-resistant tuberculosis-need for earlier identification of nontuberculosis mycobacteria. Am J Med Sci. 2009; 337: 182-184.
23. Falkinham JO 3rd. Nontuberculosis mycobacteria in the environment. Clin Chest Med 2002; 23: 529-551.
24. Tsitko I, Rahkila R, Priha O et al. Isolation and automated ribotyping of *Mycobacterium lentiflavum* from drinking water distribution system and clinical specimens. FEMS Microbiol Lett. 2006; 256: 236-243.

25. Tortoli E. Clinical manifestations of non-tuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 906-910.
26. Dailloux M, Abalain ML, Laurain C, et al. Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients. *Eur Respir J* 2006; 28: 1211-1215.
27. Marras TK, Chedore P, Ying AM, et al. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. *Thorax* 2007; 62: 661-666.
28. Coville PS, Witebsky FG. *Nocardia* and other aerobic actinomycetes, Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Bacteriology (Eds. In S. P. Boriello SP, Murray PR, Funke G), 10th ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom, 2005, p. 1137-1180.
29. Pfyffer GE, Brown BA, Swenson JM, et al. Mycobacterium: General Characteristics, Isolation and Staining Procedures. *Manuel of Clinical Microbiology* (Eds Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC) 8th edition, ASM Press, Washington DC, 2003.
30. Köksalan OK, Aydın MD, Eraslan S ve ark. Reliability of cord formation in BACTEC 12B/13A media for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in laboratories with A high prevalence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 314–317.
31. Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis*, 2001; 33: 1363-1374.
32. Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin. Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 884-901.



33. Wolinsky E. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. Clin Infect Dis 1995; 20: 954-963.
34. Blackwell V. *Mycobacterium marinum* infections. Curr Opin Infect Dis 1999; 12: 181-184.
35. Yüce A, Şener A. Akciğer tüberkülozu. Willke. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. baskı. İstanbul: Nobel Kitapevleri; 2008: 832-850.
36. Woods GL. Susceptibility Testing for Mycobacteria. Clin Infect Dis 2000; 31: 1209-1215.
37. Alp A. Non-Tüberküloz Mikobakteri İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı ve Duyarlılık Testleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı'nda, 11-12 Haziran 2003, Samsun, s 388-396.
38. Uzun M. Klinik örneklerin alınması ve laboratuvara gönderilmesi, örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. VI. Tüberküloz Sempozyumu ve IX. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı'nda, 27-29 Mayıs 2011, Manisa, s 154-166.
39. Sar Sarıgüzel N. Direkt Mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi. VI. Tüberküloz Sempozyumu ve IX. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı'nda, 27-29 Mayıs 2011, Manisa, s 167-173.
40. Baylan O. Tüberkülozun kültüre dayalı tanı yöntemleri Mikrobiyol Bul. 2005; 39: 107-111.

41. Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin klasik yöntemlerle identifikasyonu. VI. Tüberküloz Sempozyumu ve IX. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı'nda, 27-29 Mayıs 2011, Manisa, s 179-191.
42. Sürücüoğlu S. Tüberküloz dışı mikobakteri infeksiyonları: Neredeyiz? Yeni tanı yöntemleri ve sorunları. 15. Türk Klinik Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı (Ed. Akhan S), 23-27 Mart 2011, s 166-171.
43. Somoskovi A, Mester J, Hale YM, et al. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. Clin Chest Med 2002; 23: 585-597.
44. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chem 2001; 47: 809-814.
45. Çavuşoğlu C, Tortoli E pigment oluşturan iki yeni mikobakteri izolatının tanımlanması Mikrobiyol Bul 2006; 40: 185-194.
46. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993; 31: 175-178.
47. Appak Ö. Tüberküloz dışı mikobakteri etkenlerinin tür düzeyinde tanımlanması. Tez, İzmir; Dokuz Eylül Üniversitesi, 2011.
48. Kurtoğlu M, Özdemir M, Keşli R ve ark. Tüberküloz Şüpheli Hastalardan *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolasyon Oranı ve Suşların BACTEC NAP ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64 rapid Testleri ile Tanımlanması. Mikrobiyol Bul 2011; 45: 266-273.

49. Zer Y, Çiçek H, Mehli M ve ark. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2004-2006 Yılları Arasında Tüberküloz Hastalarından Soyutlanan Mikobakterilerin antitüberküloz ilaç direnci. *Klimik Derg* 2007; 20: 20-22.
50. Baylan O, Kısa Ö, Albay A ve ark. Mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2002 yılında tüberküloz olgularından izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşları ve antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları. *Gülhane Tıp Dergisi* 2003; 45: 256-262.
51. Falkinham, III JO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* 2009;107:356–367.
52. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health impacts of environmental Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 98-106.
53. Grubek-Jaworska H, Walkiewicz R, Safianowska A, et al. Nontuberculous mycobacterial infections among patients suspected of pulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 739-744.
54. Moghim S, Sarikhani E, Nasr EB, et al. Identification of nontuberculous mycobacteria species isolated from water samples using phenotypic and molecular methods and determination of their antibiotic resistance patterns by E test method in Isfahan, Iran. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15: 1076-1082.
55. Shin JH, Lee EJ, Lee HR, et al. Prevalence of non tuberculosis mycobacteria in a hospital environment. *J Hosp Infect* 2007; 65: 143-148.

56. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 908–934.
57. van Coppenraet LS, van Ingen J, de Beer JL et al. Comparison of gene targets for the differentiation of mycobacterial species. *Diagnostics of non-tuberculous mycobacteria 2009*, Doctoral thesis Chapter 8.
58. 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: 2969-2973.
59. Harmsen D, Dostal S, Roth A et al. RIDOM: Comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC Infectious Diseases* 2003, 3: 26-36.
60. Turenne CY, Tschette L, Wolfe J, et al. Necessity Of Quality-Controlled 16S rRNA Gene Sequence Databases: Identifying Nontuberculous *Mycobacterium* Species. *J Clin Microbiol* 2001; 3637–3648.
61. Yanık K. DNA sekans analiz sistemiyle nontüberküloz mikobakteri türlerinin tanımlanması Tez, Samsun; Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 2007.
62. Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3623–3630.

63. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2761– 2764.
64. Drancourt M, Raoult D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4311-4315.
65. Clarridge JE III. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 840-867.
66. Genc GE, Richter E, Erturan Z. Isolation of nontuberculous mycobacteria from hospital waters in Turkey. *APMIS*. 2013 Mar 20 (Draft).
67. Springer B, Stockman L, Teschner K, et al. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2296-2303.
68. Tortoli E, Mattei R, Russo C, et al. *Mycobacterium lentiflavum*, an emerging pathogen? *J Infect* 2006; 52: 185–187.
69. Tsitko I, Rahkila R, Priha O, et al. Isolation and automated ribotyping of *Mycobacterium lentiflavum* from drinking water distribution system and clinical specimens. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 256: 236-243.
70. Wallace RJ Jr, Brown-Elliott BA, Wilson RW, et al. Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcinum*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5689-5697.

71. Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr, Tichindelean C, et al. Five-year outbreak of community and hospital acquired *Mycobacterium porcinum* infections related to public water supplies. J Clin Microbiol 2011; 49: 4231-4938.