

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKROBAKTERİLERİN PCR-RFLP
YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şerihan Kübra EMİKOĞLU CERİT
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ADİYAMAN

2021

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKROBAKTERİLERİN PCR-RFLP
YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI**

Şerihan Kübra EMİKOĞLU CERİT

Danışman Öğretim Üyesi:

Prof. Dr. Gülnur TARHAN

Bu tez Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TIPFYL/2018-0004 nolu proje olarak desteklenmiştir.

ADİYAMAN-2021

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalanmama olanak sağlayan, desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Gülnur Tarhan'a teşekkür ederim.

Çalışmam için bana gerekli yardımları içtenlikle sağlayan Prof. Dr. Zühtü Tanıl Kocagöz'e ve Acıbadem Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma,

Dr. Öğretim Üyesi Sadık Akgün hocama, Sami Akbulak ve Mehmet Bilgin'e ve Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Laboratuvar çalışmalarında karşılaştığım türlü zorluklarda bana yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Arzu Tanrıverdi ve Sümeyya Çapuk'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Yaşadığım her zorlukta destekçim olan, sorunlarımın çözümü için çabalarını hiçbir zaman esirgemeyen Arda Cerit'e,

Hayatımın her döneminde, aldığım her kararda yanımda olan, yargılamadan koşulsuz şartsız beni destekleyerek ne kadar şanslı olduğumu bana unutturmayan canım aileme içtenlikle teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Mikobakterilerin tür düzeyinde hızlı ve doğru tanımlanması hastalığın etkene özgün tedavisi için önemlidir. Tanımlamada kullanılan konvansiyonel yöntemler uzun zaman alması, tartışmalı sonuçları ve mevcut olan 170 üzerindeki türü tanımlamadaki sınırlılıklarıyla günümüzde yerini moleküler yöntemlere bırakmıştır. Bu çalışmada Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi ile Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi'nden (Dr. İsmail Ceyhan) gönüllülük esasına dayalı olarak gönderilen solunum yolu örneklerinden soyutlanan 34 adet tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) izolatının ve 14 adet referans suşun PCR-RFLP yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) yöntemi kullanılmıştır. Laboratuvarımıza gelen izolatların Löwenstein-Jensen besi yerlerine ekimi yapılarak üremeleri sağlanmıştır. Üreyen kültürlerden alınan örneklerin kaynatma yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldıktan sonra hsp65 gen bölgesine özgün primerler kullanılarak, PCR ile amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonrası PCR ürünleri BstEII ve HaEIII enzimleri ile bir gece bekletildikten sonra DNA fragmanları referans algoritmalar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda kullanılan 34 izolattan TDM'lerin tür dağılımı; %23,52(8/34) *M. intracellulare*, %17,64 (6/34) *M. gordonae*, %17,64 (6/34) *M. abscessus*, %17,64 (6/34) *M. simiae*, %5,88 (2/34) *M. lentiflavum*, %2,94 (1/34) *M. kansasii*, %2,94 (1/34) *M. scrofulaceum* olarak belirlendi. Örneklerden 4 tanesi değerlendirilemedi.

Sonuç: Çalışmamızda kullanılan mikobakteri izolatlarından en yaygın olarak saptanan türlerin *M. intracellulare*, *M. abscessus* ve *M. simiae* olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre PCR-RFLP yöntemi mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı ve kesin tanı sağlayan faydalı bir yöntemdir. Ancak enzimle kesim işlemleri sonrasında oluşan DNA fragmanlarının değerlendirilmesi ve referans algoritmalar ile karşılaştırılması aşamalarının kritik önem taşıdığı görüldü. Özellikle görüntüleme işlemlerindeki standardizasyonun doğru türü belirlemede oldukça önemli olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Tüberküloz dışı mikobakteri, PCR-RFLP, hsp65 gen

ABSTRACT

Background: Rapid and accurate identification of mycobacteria is important for the treatment of the disease. Conventional methods used in identification have long been replaced by molecular methods with their controversial results and limitations in identifying over 170 species. In this study, it was aimed to identify 34 NTM isolates and 14 reference strains isolated from respiratory tract samples (sputum) sent from Adıyaman University Training and Research Hospital and from Atatürk Thoracic Diseases and Thoracic Surgery Training and Research Hospital (Doc. İsmail Ceyhan) according to the voluntary procedure at specify level by PCR-RFLP method.

Material and methods: In our study, Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method was used. It was ensured that the isolates coming to our laboratory were cultivated on LJ media. DNA isolation was performed by boiling the samples from the cultivated cultures and then amplified by PCR using primers specific to the hsp65 gene region. After amplification, PCR products were kept overnight with BstEII and HaeIII enzymes, and DNA fragments were evaluated by comparison with reference algorithms.

Results: Species distribution of NTMs out of 34 isolates used in our study; 23.52% (8/34) *M. intracellulare*, 17.64% (6/34) *M. gordonae*, 17.64% (6/34) *M. abscessus*, 17.64% (6/34) *M. simiae* was determined as 5.88% (2/34) *M. lentiflavum*, 2.94% (1/34) *M. kansasii* and 2.94% (1/34) *M. scrofulaceum*. 4 of the samples could not be evaluated.

Conclusion: The most common mycobacterial isolates were *M. intracellulare*, *M. abscessus* and *M. simiae*. According to this study, PCR-RFLP method is a useful method that provides faster and more precise diagnosis in comparison to conventional methods in the identification of mycobacteria at the species level. However, the steps of evaluating DNA fragments formed after enzyme cutting and comparing them with reference algorithms were found to be critical. It was concluded that standardization, especially in imaging processes, is very important in determining the correct type.

Keywords: Non-tuberculosis Mycobacteria, PCR-RFLP, hsp65 gene

İÇİNDEKİLER TABLOSU

KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER TABLOSU	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	4
2.2.1. Tüberküloz Epidemiyolojisi	4
2.2.2. TDM Epidemiyolojisi	5
2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	6
2.3.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks (MTBK)	8
2.3.2. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM):.....	10
2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması.....	16
2.5. Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı	18
2.5.1. Örneklerin Alınması ve İşlenmesi	18
2.5.2. Mikroskopik İnceleme	19
2.5.3. Kültür Yöntemleri.....	21
2.5.4. Biyokimyasal Testler	23
2.5.5. Moleküler Testler.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1. Gereçler	28
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	28
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri	28
3.1.3. Kimyasal Maddeler	28
3.2. Yöntemler.....	29
3.2.1. Bakteri İzolatları	29
3.2.2. DNA İzolasyonu	30
3.2.3. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin hsp65 Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması	30
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	31

3.2.5.	PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi.....	31
3.2.6.	Enzim Kesimi Sonrasında DNA Fragmanlarının Değerlendirilmesi	32
4.	BULGULAR.....	37
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	39
	KAYNAKLAR	42



KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
AIDS	Acquired Immun Deficiency Syndrome (Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu)
AMS	Açlık Mide Suyu
ARB	Aside Dirençli Bakteri
BAL	Bronko Alveolar Lavaj
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EZN	Ehrlich-Ziehl-Neelsen
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSP65	Heat shock protein
INH	İsoniazid
LJ	Lowenstein-Jensen
LTBI	Latent Tüberküloz Enfeksiyonu
MAC	Mycobacterium Avium Complex
MOTT	Mycobacterium Other Than Tuberculosis
MTBK	Mycobacterium Tuberculosis Complex
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NALC	N-Asetil-L-Sistein
NaOH	Sodyum Hidroksit
NTM	Non-Tuberculosis Mycobacteria
O ₂	Oksijen
OT	Old Tuberculin
PCR	Polimeraz Chain Reaction
PPD	Purified Protein Derivatives
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
TB	Tüberküloz
TDM	Tüberküloz Dışı Mikobakteri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı	7
Şekil 2: Ehrlich-Ziehl-Neelsen Boyama.....	20
Şekil 3: Auramin-rhodamine boyama	20
Şekil 4: Kültür Besiyerleri.....	21
Şekil 5: Lowenstein Jensen besiyerinde üreme	30
Şekil 6: TDM'lerden elde edilen PCR bant görüntümleri.....	37
Şekil 7: Enzim Kesim Görüntüleri	38



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Runyon Sınıflandırması.....	17
Tablo 2: Woods ve Washington Sınıflandırması.....	18
Tablo 3: PCR Reaksiyon Karışımı.....	31
Tablo 4: PCR Reaksiyon Koşulları.....	31
Tablo 5: Restriksiyon Enzim Kesim Bölgelerine Göre Mikobakteri Tür Tanımlama Cetveli.....	32
Tablo 6: Çalışmamızda Kullanılan TDM 'lerin Tür Dağılımı.....	38



1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), “*Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK)” olarak adlandırılan bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan, enfekte dokularda kitle yapan iltihapların varlığı ile kendini gösteren, canlı organizmada hücre ve doku ölümüne sebep olan kronik bir bakteriyel hastalıktır (1). TB tanı ve tedavisindeki ilerlemelere rağmen günümüzde halk sağlığı için tehdit oluşturmaya devam etmektedir. Bir hasta için bireysel bir sağlık sorunu değil, hızlı ve kolay bulaş yollarından dolayı toplum sağlığı için önemli bir problemdir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre; 2018 yılında yaklaşık olarak 10 milyon kişinin tüberküloz ile enfekte olduğu bildirilmiştir (2). Bu durum mikobakteriyel enfeksiyonların erken tanı ve tedavisinin önemini ortaya koymaktadır.

Mycobacteriaceae familyasındaki türler, insanlar ve hayvanlardaki patojenik potansiyelleri, rezervuarları, kültürde üreme süreleri ve morfolojileriyle diğer bakterilerle büyük farklılıklar gösteren bir gruptur (3). Doğada şimdiye kadar tanımlanmış 170’den fazla mikobakteri türü bulunmaktadır. Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) toprakta, suda ve hayvanlarda yaygın olarak bulunur ve insanlara kolayca bulaşabilir. Bazen insanda herhangi bir hastalığa sebep olmadan bulunabilecekleri gibi, semptomatik enfeksiyonlara da sebep olabilirler (4). TDM’lerin neden olduğu hastane enfeksiyonlarının görülme oranının son yıllarda arttığı belirtilmiştir (5). TDM’lerden kaynaklanan enfeksiyonlar; immün sistemi baskılayan kanser tedavileri, diabetes mellitus, AIDS gibi hastalıkların artışına paralel bir artış göstermektedir (6). TDM türlerinin büyük bir kısmı tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlara dirençlidirler. Bu durum hastanın gereksiz ilaç kullanımına, tedavinin etkisiz kalmasına ve maddi kayıplara sebep olmaktadır (7).

TB tanısında kullanılan konvansiyonel yöntemler bakterilerin üreme hızını, pigment üretimini, üreme sıcaklığını, koloni görünümü ile biyokimyasal özelliklerini esas alan yöntemlerdir. Geleneksel biyokimyasal yöntemler ve fenotipik testler zahmetli ve zaman alıcıdır, ancak maliyetleri düşüktür(8). Fakat TDM’lerin tür tanımlamasında biyokimyasal testler tek başına kullanıldığında her zaman doğru sonuç vermeyebilir ve yeni türlerin tanımlanmasında da yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle hızlı ve doğru tür tayini için moleküler yöntemlere başvurulmaktadır (9). Mikobakterilerin hızlı ve doğru tanımlanması tedavi başarısı için oldukça önemlidir. Bu çalışmanın amacı solunum yolu

örneklerinden izole edilen mikobakterilerin PCR-RFLP yöntemi ile tür düzeyinde tayin edilerek değerlendirilmesidir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Mikobakterilerin varlığının oldukça eskiye dayanmasına karşın, TB hastalığının fark edilmesi insanların toplu yaşama geçmesiyle olmuştur(10). Toplu yaşama geçen ilk insanların sığırları evcilleştirip enfekte etleri ve sütleri tüketmeye başladıkları, bu şekilde sığırdaki bulunan *Mycobacterium bovis* ile enfeksiyona yakalandıkları düşünülmektedir. Göçlerle bu enfeksiyonun yayılım gösterdiği öne sürülmüştür (11).

TB yüzyıllar boyunca birçok insanın ölümüne sebep olmuştur. Bu sebeple tarih boyu farklı isimlerle anılmıştır. "Ölümün Kaptanı", "Beyaz Veba", "Tüketim Hastalığı", "İnce Hastalık" bu isimlerden bazılarıdır (12).

1400 yıllarında, A.Vesalius phtisisli (fitiz;erime,tükenme) hastaların otopsilerinde derin yaralara rastlarken, F.Sylvius 'tüberkül' denilen sert düğümlerin varlığını göstermiştir. Hastalık çeşitli sebeplerle giderek artmış, 1667'de Londra'da tüm ölümlerin ¼ 'ini TB'un oluşturduğu bildirilmiştir. Hastalık İngiltere'den Batı Avrupa'ya oradan da tüm dünyaya yayılarak salgınlar oluşturmuştur. Önce Doğu Avrupa ve Batı Asya'da, 20.yüzyılın başlarında Uzak Doğu Asya ve Afrika'da yayılım göstermiştir (13).

Hastalığın bulaşıcı özellikte olabileceği ilk kez Fracastorius tarafından ortaya atılmıştır. Willemin TB'dan ölen kişilerin akciğer kavite örneklerini tavşanlara aktararak hayvanlarda hastalık oluşturmuştur.1882 yılında Berlin'de Robert Koch'un TB basilini keşfetmesi TB tarihinde önemli bir olaydır. 1884'de TB basilini klinik örneklerden izole eden Koch daha sonra basilin saf kültürünü yapmış, hayvanlarda hastalık oluşturmuş ve bu hayvanlardan bakteriyi tekrar üreterek "Koch Postulası"nı tanımlamıştır (14).

TB tanısı için yapılan çalışmalarda 1982'de Paul Ehrlich anilinli suya fuksin veya metil moru ekleyerek preparatın 15-30 dakika boyanmasını nitrik asitle renk giderildikten sonra başka bir boyayla boyanmasını önermiştir. Bu yöntem zamanla farklı bilim insanları tarafından modifiye edilmiştir. Ziehl anilinli su yerine fenol kullanılmasını önermiştir. Neelsen 1885'te asit fenikli fuksini kullanmış ve renk gidermek için sulu sülfürik asiti denemiştir. 1895 yılında Wilhem Conrad Röntgen tarafından X ışınlarının bulunmasıyla akciğerlerde TB lezyonlarına ait görüntüler ortaya çıkarılmıştır (10).

Robert Koch, aşı çalışmalarında başarıya ulaşamamıştır. TB aşısı konusunda başarılı çalışmalar yapan ilk bilim insanları Albert Calmette ve Camille Guérin olmuştur. İki bilim insanı, *M. tuberculosis*'le filogenetik olarak yakın ilişkili olan ve nadiren insanlarda, genel olarak sığırlarda TB'a neden olan *M. bovis*'in 13 yıl boyunca in-vitro kültür pasajlarını yapmışlar ve elde ettikleri avirulan basillerden hazırladıkları aşığı (Bacillus Calmette-Guérin (BCG) 1921'de ilk kez bir çocuğa uygulamışlardır (15).

TB tedavisi için yapılan çalışmalarda ise kullanılan antibiyotiklerden ilki streptomisin 1944'de bulunmuş, ardından sırası ile paraaminosalisilikasit 1946'da, izoniyazid 1952'de, pirazinamid 1954'de, etambutol 1962'de ve rifampisin 1966'da bulunmuştur (16).

MTBK dışında kalan tüm mikobakterilere, Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) (nontuberculosis mycobacteria-NTM, atipik mikobakteriler, Mycobacteriae other than tuberculosis- MOTT) adı verilmektedir. 1950'li yıllarda geleneksel TB tedavisine cevap vermeyen hastaların %1-2'sinde insan patojeni olarak tanımlanmışlardır (17).

Seksenli yıllara gelindiğinde batı ülkelerinde TB sorununun artık bittiği ve hastalığın eradike edilmesinin kısa zamanda olası olacağı düşünülmekteydi. Fakat 1985 sonrası bu ülkelerde, TB ve TDM insidansı, immün yetmezliğe neden olan "Human immunodeficiency virus" (HIV) gibi viral enfeksiyonlar ve uygulanan bağışıklığı baskılayıcı tedaviler nedeniyle yeniden artmış ve hastalık tekrar tehdit edici düzeye ulaşmıştır (18).

2.2. Epidemiyoloji

2.2.1. Tüberküloz Epidemiyolojisi

Dünya çapında ölümlerin ilk 10 nedeninden biri olarak TB gösterilmeye devam etmektedir. DSÖ, 1997'den beri her yıl küresel bir TB raporu yayınlamıştır. Raporun temel amacı, TB salgınının ve hastalığın önlenmesi, teşhisi ve tedavisinde ilerleme hakkında küresel, kapsamlı ve güncel bir değerlendirme sağlamaktır. DSÖ'nün 2019 yılında yayınladığı Küresel TB Raporuna göre 2018 yılında yaklaşık olarak 10 milyon kişinin TB ile enfekte olduğu, 1,5 milyon insanın TB nedeniyle öldüğü, 484. 000 kişinin ilaca dirençli TB ile hastalandığı bildirilmiştir. TB'yi sona erdirmeye çabalarıyla 2000-2018 yılları arasında 58 milyon hayatın kurtarıldığı belirtilmiştir. Raporda yeni TB olgularının tanımlanması ve tedavisinde küresel düzeyde ilerleme olduğu vurgulanmaktadır. Ancak raporda, Birleşmiş Milletler 'in 2030 yılına kadar küresel TB salgınını sonlandırma hedefine ulaşmak için yeterli ilerlemenin

kaydedilmediğine dikkat çekilmektedir. 2000 yılından bu yana TB'a bağlı ölümlerin HIV negatif hastalarda %27, HIV pozitif hastalarda %60 azaldığı belirtilmiştir. Rapora göre TB insidansı, 2017-2018 arasında %2 oranında gerilemiştir. İlaça dirençli TB vakaları bir yılda yaklaşık %10 azalırken, 2018'de ilaca dirençli TB olan kişilerin sadece üçte biri tedaviye erişebilmiştir (2).

Türkiye'de TB kontrolü için ilk kurum olarak, 1918'de İstanbul'da Verem Savaşı Derneğinin kurulduğu bilinmektedir (10). Verem savaşı dernekleri, verem savaşı dispanserleri yıllar içinde artış göstermiştir. 1960'larda başlayan hastaların kaydedilmesi, aylık verilerin toplanarak yıllık hale dönüştürülmesi, 2005 yılından itibaren hasta verilerinin bireysel olarak toplanması sistemine geçişle önemli bir kalite artışı göstermiştir (19).

Ülkemizde TB hasta sayısı her yıl yaklaşık %4-5 oranında azalmaktadır. TB insidansı 2005 yılında yüz binde 29,4 iken, 2018 yılında yüz binde 14,1'e düşmüştür (19). Türkiye'de 2018 yılında bildirilen toplam TB vakası 11786 olmuştur. Bunlardan %40'ı kadın, %54'ü erkek hastadır(2).

2.2.2. TDM Epidemiyolojisi

Mycobacterium cinsi özellikle immünosüpresif hastalarda kolonizasyon ve çevresel kontaminasyon yoluyla giderek artan sayıda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Çevrede yaygın olarak bulunan bu bakteriler çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir (20).

TDM'ler ile insanda tüberküloz hastalığına sebep olan mikobakterilerin ekolojisi ve fizyolojisi farklıdır. TDM'ler çoğunlukla doğada saprofit olarak bulunur. Yaşayabildikleri geniş sıcaklık ve pH aralığının olması farklı oksijen ve tuz toleranslarına sahip olmaları çevrede ve sulara yaygın olarak karşılaşılmasına sebep olmaktadır (21).

Son 30 yılda toplanan kanıtlar, TDM'nin doğal sular, içme suyu dağıtım sistemleri ve topraklar da dahil olmak üzere insan ve hayvanlarla paylaşılan çeşitli çevresel habitatların normal sakinleri olduğunu belgelemiştir. TDM'nin insanlarla ve hayvanlarla paylaşılan habitatları işgal etmesi, hastalığın kazanılmasında açıkça önemli bir belirleyicidir. TDM, içme suyu dağıtım sistemlerinde sulara ve biyofilmlerde çok sayıda görülmektedir (22).

Enfeksiyonlarının epidemiyolojisi TDM suşlarının ekolojisi ile yakından ilgilidir. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*,

Mycobacterium fortuitum, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium malmoeense*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium simiae* ve *Mycobacterium tusciae* hastane su sistemleri ve içme suyu sistemleri ve musluk suyundan izole edilen türler arasında bulunmaktadır (21).

İnsan ve hayvan sağlığı açısından en önemlisi, özellikle içme suyu dağıtım sistemleri, hastane su sistemleri ve ev tesisatlarında olmak üzere tasarlanmış habitatlardır. Burada, insan ve mikobakteriyel habitatlar üst üste binerek tekrarlayan maruz kalmaya izin verir. Suya ek olarak, toprak TDM için bir yaşam alanıdır ve toprağa maruz kalmanın *M. avium* hastalığının kazanılması için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (22).

TDM'lere sağlık bakım ünitelerinde de sıklıkla rastlanmaktadır. Bu nedenle hastane kaynaklı salgınlara yol açabileceği belirtilmektedir. TDM'lerin dezenfektanlara direnç göstermesi, geniş pH ve sıcaklık toleransı, biyofilm oluşturabilme özelliği gibi faktörler içme suyu dağıtım sistemlerinde de uzun süre kalabilmelerini sağlamıştır. TDM'lerden kaynaklanan hastane enfeksiyonlarında son yıllarda artış görülmüştür (5).

2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

TB'a sebep olan mikroorganizma bakteri alemi, Firmicutes phylumu Actinobacteria sınıfının Actinomycetales takımı içinde yer alan Mycobacteriaceae ailesinden *Mycobacterium* cinsine ait *M. tuberculosis* türüdür (23).

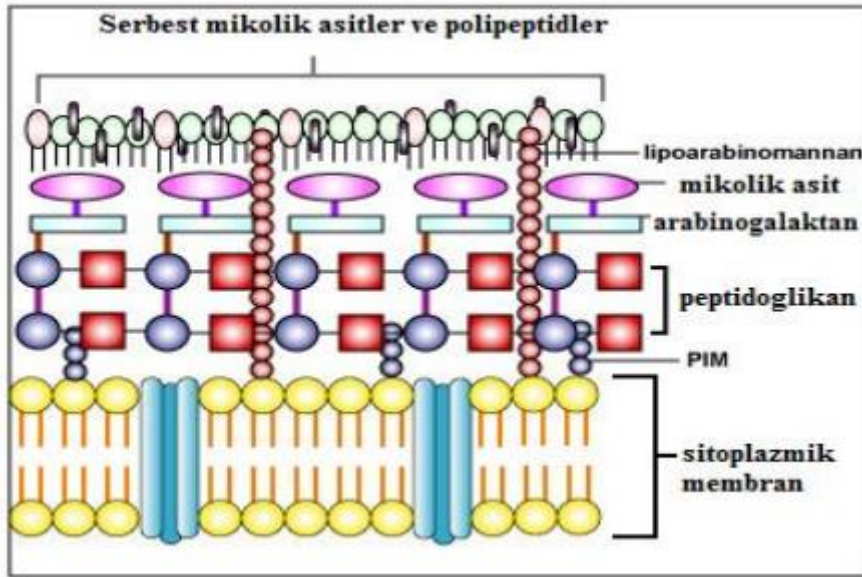
Mikobakteri cinsine ait bakteriler yüksek miktarda guanin ve sitozin içerirler (24). Mikobakteri genomunda %59 replikasyon, %30 lipid sentezi ve %10 protein sentezi ile ilgili genler bulunmaktadır (23). Mikobakterilerde genom haricinde çeşitli özellikler taşıyan kromozom dışı DNA, plazmid, transpozon ve mikobakteriofaj gibi yapılar da bulunmaktadır (24).

Mikobakteriler, aerop, sporsuz, hareketsiz, kapsülsüz, aside dirençli, silindirik, hafif kıvrık veya düzgün şekilde kord oluşturabilen, 0.3-0.6 µm eninde, 1.0-10 µm boyunda ince basillerdir. Bölünme süreleri 12-18 saattir. Yavaş ürerler, pleomorfik çomak şekilli bakterilerdir. Optimum üreme şartları pH:5-6 ve %5-10 CO₂'dir. 37°C üreme için uygun bir sıcaklıktır, ancak bu sıcaklık türden türe değişmektedir. Uygun şartlar altında 10-15 günde koloniler gözle görülmeye başlar (25). *M. tuberculosis* ve *M. bovis* iki haftadan çok, *M. avium*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. marinum* ve *M. ulcerans* bir

haftadan çok, *M. fortuitum*, *M. chelonae* türleri ise bir haftadan daha kısa bir sürede üreme gösterebilirler (26).

TDM'lerin üremeleri için katı ve sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. TDM'ler, MTBK için kullanılan besiyerlerinde rahatlıkla ürerken bazı türler için ortama katılan hemoglobin, ferrik amonyum gibi maddeler üremeyi arttırmaktadır (14).

Diğer bakterilerin hücre yapısı ile mikobakterilerin hücre yapısı benzer özellikler gösterir. Temel farklılık bazı kimyasal özellikleri ve hücre duvar yapısıdır. Mikobakterilerde gram negatif bakterilerden farklı olarak, hücre duvarının üzerinde bir dış zar bulunmaz. Gram pozitif bakterilere daha yakın bir yapı gösteriyor olmasına karşın, mikobakterilerin hücre duvarında protein ve polisakkaritler yerine özellikli lipidler yer almaktadır. (Şekil 1) Bu nedenle gram pozitif kategorisine de uymamaktadır. Genellikle kristal viyoleyi tutamazlar ve gram boyamada belirsiz hücreler şeklinde görülürler. Mikobakterilerin yüksek yağ içerikli hücre duvarı, fenol ile kombine edilmedikçe anilin ve diğer suda çözünen boyalara geçirgen değildir (23).



Şekil 1: Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı

Mikobakteriler hücre duvar yapılarında bol miktarda lipid bulundurduklarından, boyayı zor alırlar. Ancak bir defa boyandıklarında boyayı kolay bırakmaz ve asit alkol ile yapılan dekolorizasyona direnç gösterirler. Yüzey lipidlerinin hidrofobik etkileri, boyanın suda kolay eriyen organik bir madde (fenol) içinde eritilmesi ve ısıtılması ile en aza indirilir. Fenollü fuksin içine yüzey gerilimini azaltan Tween 80, dimetil sülfonat ve propilen glikoz gibi maddelerin eklenmesi de boyanma özelliğini kuvvetlendirir (14).

Ehrlich'in, TB basiliinin aside dirençli oluşunu keşfetmesi ile örneklerde basilin tespit edilmesinde önemli kolaylık sağlanmıştır. Aside dirençlilik, bazı mikroorganizmaların karbol fuksin gibi boyalarla boyandıktan sonra asit-alkol renksizleştirmesine direnç göstermesi olarak tanımlanır (23).

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 (ARB) olarak adlandırılmıştır (27).

Mikobakterilerin hücre duvarında bakterinin virülansıya ilişkili kord faktör (trehaloz glikolipidler) bulunmaktadır. Lökositlerin göçünü engelleyerek kalıcı granülomların oluşumuna sebep olur. Hücre duvarında yer alan proteinler hücrel immün yanıtın oluşumunda önemlidir. Bu proteinlerin saflaştırılmış türevleri (PPD=purified protein derivatives gibi) TB deri testinde kullanılmaktadır (28).

Mikobakterilerin lipit, protein ve polisakkaritlerden oluşan antijenleri vardır. Bunlardan “old tuberculin” (OT), Robert Koch tarafından bulunan ve tüberkülin deri testinde kullanılan ısıya dayanıklı bir proteindir (29).

OT'nin pürifiye edilmesiyle pürifiye protein deriveleri (PPD) elde edilir. DSÖ tarafından tüberkülin deri testinde kullanılması kabul edilmiştir (28).

Mikobakteri cinsi içindeki türlerin tanımlanması ve gruplandırılmasında çeşitli araştırmacılar tarafından farklı yöntemler kullanılmıştır. Genetik özellikleri birbirine çok yakın olan türler “kompleks” olarak adlandırılmıştır. (*M. avium* kompleksi, *M. tuberculosis* kompleksi vb.)

2.3.1. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK)

TB, MTBK adı verilen ve insanlar da dahil olmak üzere geniş bir memeli grubunu enfekte eden, birbirine benzeyen, üreme hızı yavaş olan bir mikobakteri grubundan kaynaklanan bir hastalıktır. Enfeksiyon, TB basili içeren 1 – 5 µm damlacık çekirdeği soluduğunda, basilin alveollere ulaşması sonucu ortaya çıkar. Maruz kalındıktan sonra, MTBK konağın bağışıklık sistemi tarafından yok edilebilir. Aktif TB hastalığı; bölgesel lenf düğümleri, akciğer, böbrekler, beyin, gırtlak ve kemik gibi vücudun farklı bölgelerinde ortaya çıkabilir veya latent TB enfeksiyonu (LTBI) oluşturulabilir (30).

MTBK; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG), *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium africanum*,

Mycobacterium pinnipedii, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium orygis* ve birkaç bakteriyi daha içine alan gruptan oluşur (3).

***Mycobacterium tuberculosis*:** Zorunlu hücre içi patojendir. Aerobik, aside dirençli, kapsülsüz, sporsuz bir basildir. Akciğer gibi oksijen zengin dokularda başarılı bir şekilde büyür. Diğer bakterilerin hücre duvarıyla karşılaştırıldığında hücre duvarı lipid bakımından oldukça zengindir. Bölünme süresi (15-20 saat) uzundur (31).

M. tuberculosis pigment oluşturmaz, yumurtalı besiyerinde 2–6 haftada kuru, krem rengi, düzensiz R tipi koloni oluşturur. Niasin ve nitrat redüksiyon testi pozitifdir. Besiyerinde gliserin varlığının üremelerini hızlandırdığı ortaya konmuştur (14).

***Mycobacterium bovis*:** *M. bovis*; sığır, ve geyik gibi sıcakkanlı hayvanlarda TB'ye neden olur. Primatlara ve insanlara bulaşabilir. Avrupa'daki TB olgularının % 30'una kadarı 1900'lerde *M. bovis*'e neden olmuş ve enfekte sığırlardan bulaşıcı damlacıkların solunması ve kontamine, pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketimi yoluyla insanlara bulaşmıştır (32).

M. tuberculosis'e göre daha zor ve uzun sürede ürerler (4-8 hafta). Mikroaerofiliklerdir. İndirgenmiş oksijenli atmosferik koşullarda çoğalabilir. Besiyerinde gliserin kullanılması *M. tuberculosis*' te olduğu gibi olumlu etki yaratmaz. Ancak piruvat eklenirse üreme uyarılmış olur (33).

M. bovis izolatları, pirazinamide (PZA) kendinden dirençlidir, ancak TB tedavisinde kullanılan diğer ilaçlara duyarlı olabilir. Bu MTBK izolatlarını tür düzeyinde tanımlamanın önemli olmasının sebeplerinden biridir. *M. bovis* bulaş riski taşıyan insanlar arasında hayvanlarla çalışan bireyler veya çiğ (pastörize edilmemiş) süt içen veya çiğ süttten yapılan süt ürünleri tüketenlerde risk faktörüdür (34).

***Mycobacterium bovis BCG*:** TB aşısı için *M. bovis*'in canlı, atenüe BCG suşu kullanılır. Bu suş, çoğu konakçıda patojenik değildir. Aşı yüksek prevalanslı alanlarda öncelikle küçük çocuklarda yaygın hastalığı önlemek için kullanılır. Küçük çocuklar için aşılama protokolleri, TB insidansında %60 -80 oranında azalmaya neden olur. *M. bovis* ve *M. bovis* BCG hastalıklarının *M. tuberculosis* hastalığından hızla ayrılması, tedaviyi optimize etmek, temas araştırması yapmak ve sağlık sisteminin çeşitli düzeylerinde ek kontrol önlemleri uygulamak için çok önemlidir (3).

***Mycobacterium caprae*:** MTBK'nin bir üyesi olan *Mycobacterium caprae*, insanlarda ve hayvanlarda TB'a neden olur. *M. caprae* genotipleme, epidemiyoloji ve ilaç duyarlılık çalışmalarında farklı özellikler göstermektedir (35). Bu patojen ağırlıklı olarak sığırdan izole edilmiştir. Zaman zaman domuzlar, geyik ve insandan izolasyonu da bildirilmiştir. Bulaşma yolu olarak en sık hayvancılıkla gerçekleştiği bildirilmiştir (36).

***Mycobacterium africanum*:** MTBK içinde farklı bir alt tür olarak tanımlanmıştır. Batı Afrika'da insan TB'unun yarısına neden olduğu bildirilmiştir. *M. tuberculosis* gibi *M. africanum* suşları pirazinamide duyarlıdır. Bununla birlikte nitrat negatiftir ve piruvat takviye edilmiş ortamlarda, mikraerofilik olarak büyüme eğilimindedir (35).

Klinik tablo veya hastalık seyri *M. tuberculosis* ile aynıdır, ancak hayvanlarda *M. africanum* daha az virülan görünmektedir (36).

***Mycobacterium pinnipedii*:** *M. tuberculosis* kompleks üyesidir. Genellikle deniz canlılarında görülür. Ancak tavşanlar, muhtemelen sığırlar ve insanlar için de patojendir. Genellikle lenf nodlarında, akciğer, plevra ve dalakta granülatöz lezyonlar oluşturmaktadır (33).

2.3.2. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM):

TDM'ler kolonizasyon, enfeksiyon veya hastalığa neden olabilir. Kolonizasyon ve enfeksiyon geçici, aralıklı veya uzun süreli olabilir. İnsanlar çevrede TDM ile düzenli temasta olduğundan, TDM solunum ve gastrointestinal kanallarda veya sağlıklı bireylerin cildinde tespit edilebilir. TDM, arıtılmış kentsel su ve kanalizasyon sistemleri gibi doğal ve insan yapımı ortamlarda büyüebilir. Yüzme havuzları, sıcak tüp, pedikür ayak banyoları, duşlar, dövme mürekkepleri, balık tankları, endoskoplar ile bunların çamaşır makineleri, ısıtıcı-soğutucu cihazları, cerrahi çözeltileri soğutmak için kullanılan buz makineleri ve yetersiz sterilize edilmiş cerrahi ekipman veya çözeltiler gibi tıbbi cihazlarda görülebilir (3).

TDM'nin en yaygın klinik belirtisi kronik akciğer hastalığıdır. TDM akciğer hastalığının belirtileri değişkendir ve spesifik değildir. Ancak, neredeyse tüm hastalar kronik veya tekrarlayan öksürük göstermektedir. Diğer semptomlar değişken olarak balgam üretimi, yorgunluk, halsizlik, dispne, ateş, hemoptizi, göğüs ağrısı ve kilo kaybını içerir. Fiziksel bulgular spesifik değildir ve bronşektazi ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi altta yatan pulmoner patolojiyi yansıtır (9).

M. tuberculosis ve TDM arasındaki biyolojik farklılaşma önemlidir. Çünkü enfeksiyonun kaynağı, tedavisi ve hastalığın seyrinde temel farklılıklar anlamına gelir. Benzer şekilde, TDM çalışılmasının önemi sadece klinik uygunluğundan değil, aynı zamanda, cinsin bazı türlerinin patojen olduğu, diğerlerinin olmadığı ilgili mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. TB epidemiyolojisi kapsamlı bir şekilde incelenmiş olmasına rağmen, kısmen TDM hastalıklarının genellikle halk sağlığı merkezlerine rapor edilmemesi nedeniyle dünya çapında görülme sıklığı ve yaygınlığı hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ek olarak, TDM'nin büyük çoğunluğu doğal olarak *M. tuberculosis*'e karşı kullanılan ilaçlara karşı dirençli olduğu için, yanlış ilaçlarla tanımlanmaları ve çok ilaca dirençli *M. tuberculosis* suşları olarak bildirilmeleri alışılmadık bir durum değildir (37).

TDM için uygulanabilecek tedavi tüberkülozdan farklı olduğundan tür düzeyinde tanımlanmaları oldukça önemlidir (15).

***M. avium-intracellulare* kompleks:** *Mycobacterium avium* kompleksi (MAC) üyeleri yavaş büyüyen, pürüzsüz, düz ve şeffaf koloniler oluşturur. MAC, solunum örneklerinde en sık patojen olarak tanımlanan TDM'lerden biridir. Başlangıçta, *M. avium* ve *Mycobacterium intracellulare* olmak üzere iki tür içermekte iken sonradan bu gruba *M. avium*'un dört alt türü olan, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, dahil edilmiştir (38). Bu alt türleri genetik olarak çok yakındır, ancak konakçı aralıkları ve patojenisiteleri bakımından büyük farklılıklar gösterirler (39).

M. avium ve *M. intracellulare* türleri biyokimyasal testlerle genel olarak tepkime vermezler. Sadece ısıya dirençli katalaz testleri pozitifdir. Bu nedenle bu iki türü klasik fenotipik yöntemler ile birbirinden ayırmak olanaksızdır (40).

MAC klinik olarak önemli TDM'leri içerir ve MTBK'den sonra mikobakteri cinsindeki ikinci en büyük tıbbi komplekstir. MAC suşları sıklıkla dünya çapında izole edilir. MAC, HIV / AIDS'li hastaların % 40'ını etkileyen ve ABD'de en yaygın NTM patojen grubu olan oldukça ölümcül sistemik bakteriyel enfeksiyonun önde gelen nedeni olarak kabul edilir (37).

MAC'inin neden olduğu akciğer enfeksiyonu bağışıklık sorunu olmayan konakçılarda da yayılabilir (41).

Boyanma bakımından *M. tuberculosis*'e benzerler. Boyayı iyi alırlar ve düzgün bir şekilde boyanırlar. Pleomorfik şekillilerdir. Yumurtalı besiyerinde pigmentsiz koloniler yaparlar. 37°C'de en az 10 günde ürer. 25-45 derecelerde üreyebilirler (26).

***Mycobacterium simiae*:** Yavaş büyüyen TDM'ler arasında olan *M. simiae*, 1965 yılında maymunlarda tespit edilmiştir (42). Fotokromojen olan bu mikobakteri ışığa maruz kaldığında sarı pigment üretir (43). Bu organizma belediye su kaynaklarında ve ayrıca toprak, tuz, gıda maddeleri ve hatta hava örneklerinde bulunabilir. Ayrıca tıbbi ekipmanı ve laboratuvar örneklerini kontamine edebilir. *M. simiae*, aerosollerin solunması ile bulaşır. İnsandan insana veya hayvandan insana bulaşma kanıtı olmadığından, insan hastalığı çevresel maruziyete bağlanır. *M. simiae* başlangıçta çevresel bir patojen olarak düşünülmüştür ve nadiren insan hastalıkları ile ilişkilidir. Daha yakın zamanlarda, *M. simiae*'nin asemptomatik bir enfeksiyondan ölümcül yayılan bir hastalığa kadar uzanan bir dizi klinik sendroma neden olduğu açıklanmıştır. *M. simiae* çoğunlukla akciğer hastalığına neden olur (43).

***Mycobacterium marinum*:** *M. marinum*, 30 ° C -33 ° C arasındaki sıcaklıklarda en uygun şekilde büyüyen, fotokromojenik, yavaş büyüyen (8 -12 gün) bir mikrorganizmadır. *M. marinum* balık veya karides yüzgeçlerinden delinme nedeniyle tatlı su veya tuzlu suda parmak, el, kol, dirsek, diz veya ayak parmağı yumuşak doku yaralanmasının sonucu olan "yüzme havuzu granülomu" veya "akvaryum granülomunun" ve "balıkçı parmağı" hastalıklarının etkenidir. Akvaryumların veya havuzların temizlenmesinden sorumlu kişilerde sıklıkla görülebilir. Bununla birlikte, uygun klorlama yüzme havuzlarındaki kolonizasyonu önemli ölçüde azaltmıştır (3).

Kültür için Middlebrook 7H10, 7H11 ve antibiyotikli Lowenstein-Jensen besiyerleri kullanılabilir. Bu kültürlerde 7-10 gün içinde gözlenen üreme koyu renkli pigmente olmayan koloniler şeklindedir. Bunu takiben ise 24-48 saat içinde sarı renkli pigmentli koloniler gözlenebilir (44).

***Mycobacterium kansasii*:** *M. kansasii* yavaş üreyen bir fotokromojenik mikobakteridir. *M. kansasii*, birçok ülkede TDM hastalığının ikinci en yaygın nedenidir (45). İnsan örneklerindeki bakterilerin izolasyonu neredeyse her zaman hastalık ile ilişkilidir. Bakterilerin ana rezervuarının musluk suyu olması muhtemeldir. Risk faktörleri arasında pnömokonyoz (özellikle madencilerde), kronik obstrüktif akciğer hastalığı, malignite ve alkolizm bulunur. Yaygın enfeksiyonlar, hücresel bağışıklığı bozulmuş hastalarda görülebilir (3).

Mikroskop görüntüsü *M. tuberculosis*'den daha uzun ve daha kalın görünümündedir. Bazı bölgeleri koyu, bazı bölgeleri açık boyanır. İçinde gliserol ve yumurta bulunan besiyerlerinde ürerler. Işıksız ortamda 37°C'de 10-21 günde pigmentsiz koloniler meydana getirirler. Ancak koloniler ışıklı ortamda sarı renge dönerler (14).

***Mycobacterium malmøense*:** *M. malmøense* ilk olarak İsveç'in Malmö şehrindeki bir hastadan izole edilmiştir. *M. malmøense* genellikle altta yatan kronik akciğer hastalığı olan, genellikle kaviter tutulumu olan çocukların veya yetişkinlerin balgam veya servikal lenf düğümlerinden izole edilmiştir. Bugüne kadar izolatların çoğu kuzey Avrupa, Zaire ve Japonya'dan bildirilmiştir. Üreme süresi uzundur ve 8-12 hafta kadar inkübasyon gerekebilir (3).

***Mycobacterium xenopi*:** *M. xenopi* enfeksiyonunun klinik ve radyolojik hastalık belirtileri hastanın immünolojik durumuna göre değişir ve üç gruba ayrılabilir; önceden var olan akciğer hastalığı olan hastalarda kaviter form, immünokompetan hastalarda soliter nodüler form ve immün sistemi baskılanmış hastalarda akut infiltrat formu (46).

İlk olarak 1957 yılında Afrika kurbağası olan *Xenopus laevis*'in deri lezyonlarından izole edilmiştir. Optimal üreme sıcaklığı 45 °C' dir. Sıklıkla sıcak su sistemlerinden, özellikle hastanelerde, nozokomiyal (hastane) enfeksiyonlara veya psödoenfeksiyonlara (toplama sırasında klinik örneklerin veya bronkoskopların kontaminasyonu) yol açabilecek şekilde bulunabilir (33).

***Mycobacterium haemophilum*:** *M. haemophilum*, katı ortamda daha iyi üreyebilen ve bir demir kaynağı olarak hemin veya hemoglobin gerektiren 28 ° C -30 ° C' lik optimum büyüme sıcaklığına sahip bir mikobakteridir. Özel büyüme koşulları nedeniyle, bu mikroorganizma genellikle az tanınmaktadır (3) .

Ekimden sonra 2-4. haftada pürüzlü ya da düzgün kenarlı tipik koloniler oluşturur. Mikroskopide kısa, kıvrık, yapıda görünür. Aside dirençlidir. Pirazinamidaz pozitifdir. Bunun dışındaki mikobakterilerin identifikasyonu için yaygın kullanılan tüm biyokimyasal test sonuçları negatiftir (47).

M. haemophilum genellikle ekstremiteler gibi daha serin vücut bölgelerini enfekte eder. Enfeksiyonların çoğu AIDS hastalarında görülür. Organ nakli, kemik iliği alıcıları veya uzun süreli steroid kullanıcıları olan bağışıklık sistemi baskılanmış diğer hastalarda da rastlanmıştır. Klasik klinik görünüm, çoklu cilt lezyonları veya yumuşak doku

enfeksiyonlarıdır. Enfeksiyonlar ayrıca servikal lenfadeniti olan bağışıklık yetmezliği olan çocuklarda ve pulmoner nodülü olan bir hastada tespit edilmiştir (3).

***Mycobacterium szulgai*:** *M. szulgai* , yavaş üreyen bir mikobakteri olup, 37°C'de skotokromojenik ve 25°C'de fotokromojeniktir (48). Yumurtalı besiyerinde, 37°C'de, 12-28 gün arasında portakal renkli bazen S, bazen R tipinde olan koloniler oluşturur. Işıklı ortamda pigment koyulaşır (14).

M. szulgai ile akciğer enfeksiyonlarının klinik görüntüsü TB'den ayırt edilemez ve genellikle alkol kullanımı, sigara içimi ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan orta yaşlı erkeklerde gelişir. Diğer akciğer dışı klinik belirtiler arasında hem AIDS hastalarında hem de immünokompetan hastalarda çeşitli enfeksiyon tablolarına rastlanmıştır (3).

***Mycobacterium genavense*:** *M. genavense*, mikobaktini J eklenmiş sıvı ortamda daha iyi üreyen bir mikobakteridir. İlk olarak İsviçre'nin Cenevre kentinde AIDS'li bir hastanın kanından izole edilmiştir. *M. genavense*'in klinik izolasyonu genellikle HIV ile ilişkili veya immünosupresyonun diğer nedenleriyle ilişkilidir. Bu mikobakteri, yayılmış hastalıkları olan AIDS hastalarından ,lenfadenitli bireylerin kemik iliği, karaciğer, dalak, dışkı ve kan örneklerinden ,genital ve yumuşak doku enfeksiyonu olan bireylerden izole edilmiştir (49) .

Yavaş üreyen ve nonfotokromojen gruba dahildir. Semikantitatif ve ısıya dirençli katalaz, üreaz, Tween 80 hidrolizi ve pirazinamidaz deneyleri pozitifdir (50).

***Mycobacterium scrofulaceum*:** *M. scrofulaceum*, 25 ° C ve 37 ° C'de skotokromojenik olan yavaş üreyen bir mikobakteridir. Bu tür ismi, mikobakteriler tarafından servikal lenf düğümlerinin enfeksiyonlarını tanımlamak için kullanılan histolojik “skrofula” teriminden türetilmiştir. 1980'lerde çocuklarda mikobakteriyel servikal lenfadenitin yaygın nedeni olarak ortaya atılmıştır (51).

Doğada toprakta, musluk sularında, çiğ sütte ve süt ürünlerinde bulunabilmektedir. İnsana bulaş konusunda çeşitli yollar olduğu düşünülmektedir. *M. scrofulaceum* enfeksiyonu çocukluk çağında daha sık olmak üzere erişkinlerde de görülebilmektedir (52).

***Mycobacterium gordonae*:** Çok sık karşılaşılan ancak patojenik olmayan bir mikobakteri türüdür (33). Musluk sularında ve toprakta saprofit olarak bulunur.

Balgamda hastalık etkeni olmadan görülebilir. Katı besiyerinde 37°C’de 7-14 gün içinde ürerler. Işıktaki ve karanlıkta sarı, turuncu, düzgün koloniler oluştururlar (26).

***Mycobacterium shimoidei*:** Tüberküloz dışı mikobakteri grubundan pigmentsiz, yavaş üreyen türdür. *M. malmoense* ve *M. haemophilum* ile benzer fenotipik özelliklere sahiptir. Akciğer patojeni olarak ilk kez Japonya’da görülmüştür. Avrupa, Kanada, Madagaskar gibi bölgelerde de olgular bildirilmiştir (53).

***Mycobacterium abscessus*:** Sıklıkla klinik örneklerden izole edilir. Dünya çapında su, toprak ve tozda bulunur. Çok çeşitli enfeksiyonlardan sorumludur. Bu mikroorganizmalar genellikle cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olur, ancak yaygın hastalık da dahil olmak üzere daha ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler. Altta yatan kronik akciğer hastalığı olan kişilerde ciddi akciğer enfeksiyonları ortaya çıkabilir. Altta yatan solunum rahatsızlıkları veya bağışıklık sistemi bozulmuş diğer bireyler akciğer enfeksiyonu riski altında olabilir. Deri enfeksiyonlarına genellikle *M. abscessus* ile kontamine olmuş maddelerin enjeksiyonu, kontamine ekipman kullanılması veya hijyenik gerçekleşmeyen pedikür neden olabilir (53).

Mycobacterium abscessus kompleksine ait mikroorganizmaların taksonomisi konusunda tartışmalar olsa da tüm genom dizileme verileri üç alt türün varlığını güçlü bir şekilde desteklemektedir. Bunlar; *M. abscessus* subsp. *bolletii* , *M. abscessus* subsp. *massiliense* ile *M. abscessus* subsp. *abscessus*’dir (54). *M. abscessus* hızlı üreyen, pigmentsiz bir mikobakteridir. *M. chelonae*’ye benzerlik gösterir (55).

***Mycobacterium fortuitum* kompleksi:** *M. fortuitum* çevresel, non-kromojenik olmayan ve hızlı üreyen bir mikobakteridir. *Mycobacterium fortuitum* kompleks türleri, *M. fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium porcinum*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium setense*, *Mycobacterium houstonense*, *Mycobacterium boenickei*, *Mycobacterium septicum*, *Mycobacterium brisbanense* ve *Mycobacterium neworleansense*’dir. *M. fortuitum* lipopnömoni, gastroözofageal bozukluklar veya yaygın hastalıklar haricinde nadiren akciğer hastalığına neden olur. Sıklıkla cilt, yumuşak doku ve kemik enfeksiyonları ile ilişkilidir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, plastik cerrahi müdahaleleri veya kalp cerrahisi (sternal yara enfeksiyonları) sonrasında yaygındır. Pedikür salonlarındaki ayak banyoları da *M. fortuitum* ile ilişkili olarak gösterilmiştir (56).

Mycobacterium chelonae kompleksi: *M. chelonae* kompleksi *M. chelonae* ve üç diğer türden oluşur. (*Mycobacterium franklinii*, *Mycobacterium immunogenum* ve *Mycobacterium salmoniphilum*). *M. chelonae* önemli bir insan fırsatçı patojenidir. Musluk suyu veya tatlı su ve deniz suyu gibi ortamlardan yaygın olarak izole edilebilen, non-kromojenik, hızlı üreyen bir mikobakteridir. En yaygın klinik bulgular cilt, yumuşak doku ve kemik enfeksiyonlarıdır. Genellikle enfekte olmuş delici yaralar, kontamine dövme mürekkepleri, plastik cerrahi veya liposuction ile ilişkilidir. Yaygın hastalıklar özellikle yüksek doz steroid alanlarda ve immün sistemi baskılanmış kişilerde tanımlanmıştır. Enfeksiyonları ayrıca kontakt lens aşınması (keratit) ile ilişkili olabilir. *M. chelonae*'nin pulmoner enfeksiyonları *M. abscessus* enfeksiyonlarından daha az yaygındır (3). Kolonileri 7 gün içinde oluşur ve 22-40°C'de ürerler (26).

2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Mikobakteriler genel olarak hızlı ve yavaş üreyenler olmak üzere ikiye ayrılırlar (57).

Mikobakterilerin sınıflandırılmasında günümüzde kullanılan sınıflandırmalar şu şekildedir;

Runyon sınıflandırması: Ernest Runyon tarafından 1959 yılında, mikobakteriler; kültürde üreme hızları, pigment üretimi ve koloni morfolojilerine göre sınıflandırılmıştır(58).(Tablo 1)

Grup I Fotokromojenler: Sadece ışıktaki sarı renkli pigment oluşturan mikobakteriler (*M. kansasii*, *M. marinum*),

Grup II Skotokromojenler: Karanlıkta sarı veya kırmızı renkli pigment oluşturan mikobakteriler (*M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. gordonae*),

Grup III Nonfotokromojenler: Pigment oluşturmeyen mikobakteriler (*M. avium-intracellulare*, *M. terrae*, *M. xenopi*),

Grup IV Hızlı Üreyenler: Üremek için bir haftadan daha az bir süreye ihtiyaç duyan hızlı üreyen mikobakteriler (*M. fortuitum-chelonae* complex, *M. peregrinum*, *M. abscessus*)(58).

Tablo 1: Runyon Sınıflandırması

Kategori	Üreme Hızı	Pigment Üretme	Organizmalar
Runyon 1 Fotokromojen	Yavaş	Işıktaki sarı-turuncu pigment üretimi	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. simiae</i>
Runyon 2 Skotokromojen	Yavaş	Karanlıkta ve ışıktaki sarı-turuncu pigment üretir	<i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. flavescens</i>
Runyon 3 Fotokromojen Olmayanlar	Yavaş	Karanlıkta ve ışıktaki pigmentless	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. gastri</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i> <i>M. xenopi</i>
Runyon 4 Hızlı Üreyenler	Hızlı	Karanlıkta ve ışıktaki pigmentless	<i>M. fortuitum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. thermoresistibile</i>

Woods ve Washington Sınıflandırması: 1987’de klinik önem kazanan diğer mikobakterileri de içine alan klinik ve moleküler uyumlu bir sınıflandırma yapmışlardır (Tablo 2):

- Klinik önemi olan mikobakteriler,
- İnsana potansiyel patojen türler,
- İnsana nadiren patojen saprofitik türler(59).

Tablo 2: Woods ve Washington Sınıflandırması

Klinik önemi olan mikobakteriler	<i>M. tuberculosis</i> kompleks <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> (<i>M. bovis</i> BCG) <i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> <i>M. canetti</i>		
İnsanda potansiyel patojen olan mikobakteriler	<i>M. avium-intracellulare</i> kompleks <i>M. kansasii</i> <i>M. fortuitum-chelonae</i> kompleks <i>M. scrofloceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgari</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. genavense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. celatum</i>		
İnsanda nadiren hastalık yapan saprofitik türler	Yavaş üreyenler <i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae-triviale</i> komp. <i>M. shimoidei</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i>	Orta hızda üreyenler <i>M. flavescens</i>	Hızlı üreyenler <i>M. thermoresistible</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. paraafortuitum</i> kompleks

2.5. Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı**2.5.1. Örneklerin Alınması ve İşlenmesi**

Mikobakterilerin mikrobiyolojik tanısı için uygulanması gereken bazı prosedürler vardır. Tanının doğru yapılabilmesi için öncelikle örneğin uygun şekilde alınmasına

dikkat edilmelidir. En sık kullanılan örnek balgamdır ve birbirini takip eden 3 gün sabah balgamı şeklinde alınmalıdır. Uygun steril kapaklı tüpler kullanılmalıdır. Balgam haricinde bronkoalveolar lavaj (BAL), açlık mide suyu (AMS), idrar, steril vücut sıvıları, doku, dışkı gibi çeşitli klinik örnekler de kullanılabilir (60).

Mikobakterilerin izolasyonu için klinik örneklerin normal floralarını ve örnek alınma sırasında oluşabilecek kontaminasyonları en aza indirmek için homojenizasyon/dekontaminasyon işlemleri uygulanmalıdır. Bakteri yoğunluğunu arttırmak için konsantrasyon işlemi uygulanır (9).

Günümüzde rutinde en sık kullanılan homojenizasyon/dekontaminasyon yöntemi N-asetil-L-sistein (NALC)-Sodyum hidroksit (NaOH) yöntemidir. Bu yöntemde NALC mukolitik, NaOH dekontaminant ve sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını tutarak NALC'ın inaktive olmasını engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin hacmine eşit miktarda NALC-NaOH eklenerek, vorteks ile iyice karıştırılır ve 15 dakika beklenir. Bekleme işlemi tamamlandıktan sonra fosfat tamponu uygulanarak nötralizasyon sağlanır. Santrifüj uygulanarak elde edilen çökelti sonraki basamaklarda kullanılmak üzere alınır (61).

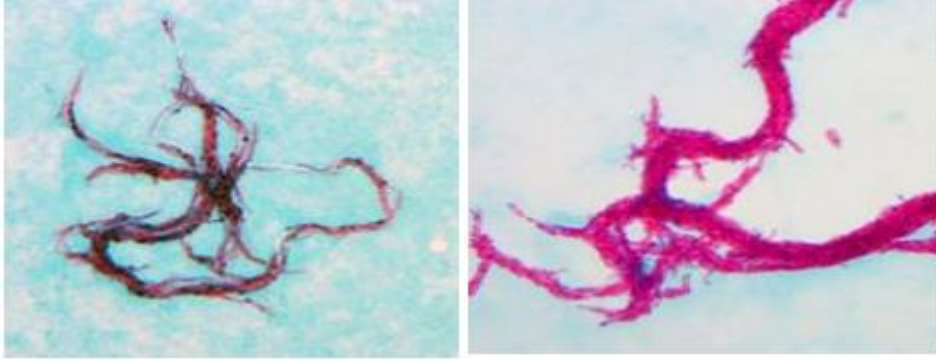
Günümüzde homojenizasyon/dekontaminasyon yöntemi olarak kullanılan Zefiran-trisodyum-fosfat yöntemi, Oksalik asit yöntemi, Setilpridinyum klorid-sodyum klorid yöntemi, Sülfürik asit yöntemi gibi yöntemler de mevcuttur (62).

2.5.2. Mikroskopik İnceleme

Klinik örneklerde ARB aranması amacıyla kullanılan mikroskopi hızlı bir şekilde uygulanabilen, düşük maliyetli, zahmetsiz bir yöntemdir. Her düzey tanı laboratuvarında uygulanabilen bu yöntemin en önemli dezavantajı aside dirençli basilin görülebilmesi için, örnekte 5.000–10.000 basil/ml olması gerekmesi ve yöntemin duyarlılığının düşük olmasıdır (19).

Mikobakterilerin mikroskopisi için iki tip boyama yöntemi geliştirilmiştir. Karbol fuksin boyama (Ehrlich Ziehl-Neelsen (EZN) veya Kinyoun) ve florokrom boyama yöntemleri.

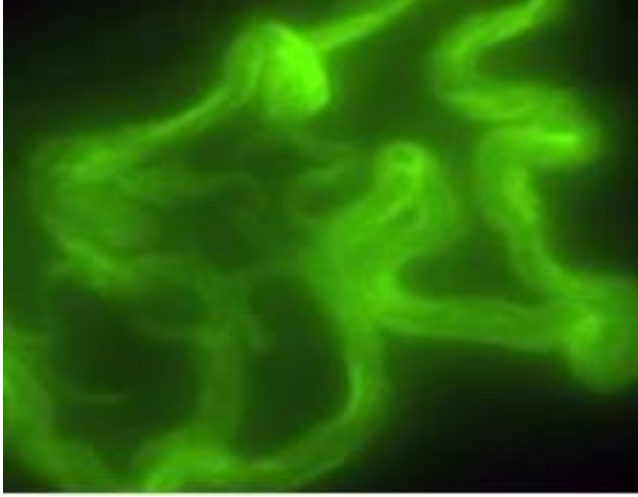
Karbol Fuksin (Ehrlich Ziehl-Neelsen ve Kinyoun): Karbol fuksin boyama metodlarının duyarlılığı %22-80'dir. En sık kullanılan karbol fuksin metodu Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) metodudur. (Şekil 2) Bu yöntemde, kaynamayacak şekilde alttan ısıtma ile preparat hazırlanır (14).



Şekil 2:Ehrlich-Ziehl-Neelsen Boyama

Kinyoun boyama yöntemi EZN yöntemine benzer, fakat kullanılan karbol fuksin ve fenol konsantrasyonu artışı sayesinde ısıtma işlemi yapılmayan bir boyama yöntemidir (soğuk karbol fuksin boyama) (63).

Florokrom Boyama (Rhodamine-Auramine): Florokrom boyama metotlarının duyarlılığı %52-97'dir. En sık kullanılan florokrom boyama metodu ise auramin-rodamindir. Bu metotta 40x büyütme yeterlidir (47). Florokrom boyamada ana ilke fenollü fuksin yerine floresan boyaların, mikobakterilerin lipitten zengin hücre duvarına bağlanarak, görünür hale gelmesini sağlamaktır (şekil 3) (15).



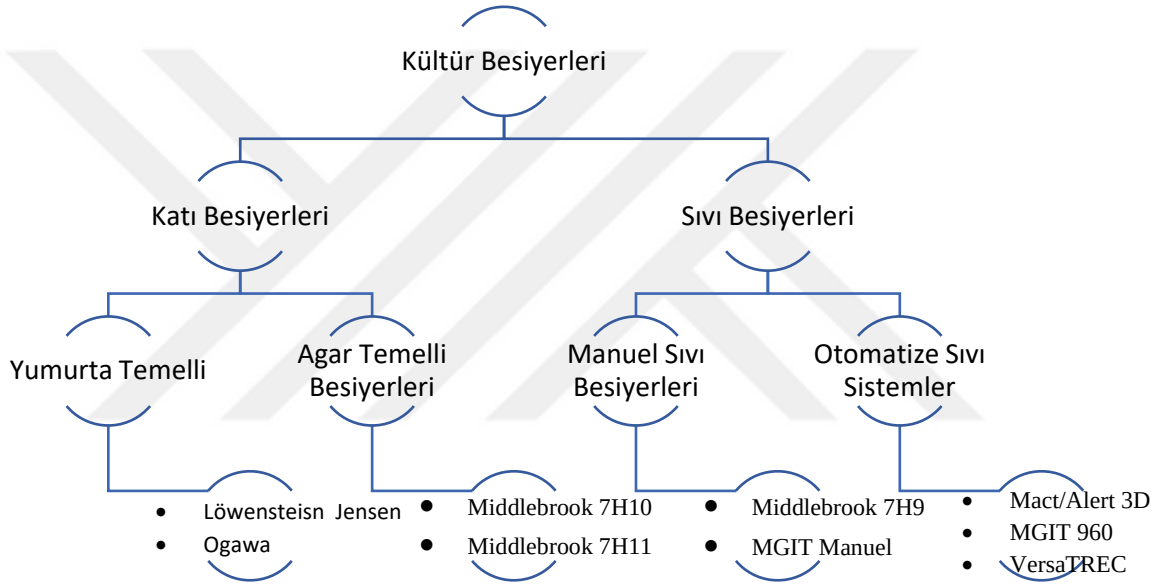
Şekil 3:Auramin-rhodamine boyama

Auramin-rhodamine boyama (ARB) yöntemi EZN'ye göre daha hassastır ve kısa zamanda geniş bir tarama imkanı vermektedir (64). Sonuçları yorumlarken her ARB negatif sonucun hastanın TB olmadığı anlamına gelmediği bilinmelidir. Yüksek özgülüğe rağmen her pozitif sonuç da TB anlamına gelmeyebilir. Pozitif sonuçların

herhangi bir TDM de olabileceğine dikkat edilmelidir. Sonuçlar klinik bulgular ve diğer tanısal testlerle birlikte yorumlanmalı ve kültür ile doğrulanmalıdır. Yayma pozitif bulunan preparatlar, kalite kontrol açısından en az kültür sonucu çıkana kadar ya da 3 ay süre ile saklanmalıdır (19).

2.5.3. Kültür Yöntemleri

Mikobakterilerin tanısında kültür günümüzde hala altın standart olarak görülmektedir. Kültür yöntemleri geç sonuçlanmasına karşın direkt mikroskopiden daha duyarlıdır (65). Mikobakteri izolasyonunda kullanılan besi yerleri katı ve sıvı olarak ikiye ayrılır (60). (Şekil 4)



Şekil 4: Kültür Besiyerleri

Kültürde üreme şansını arttırmak için sıvı ve katı besiyeri beraber kullanılmalıdır. Sıvı besiyerleri mikobakteriler dışındaki diğer bakterilerin üremelerine de imkan verdiğinden tek başına kullanımları uygun değildir. Sıvı besiyerlerinde üreme katı besiyerine kıyasla daha hızlı gerçekleşir. Katı besiyeri sıvı besiyerine göre üreme hızının gözlemlenebilmesi ve üreyen kolonilerin şekli pigmenti açısından değerlendirilebilmesi bakımından daha avantajlıdır. Katı besiyerinin sıvı besiyerine göre avantajları ise koloni morfolojisinin ve üreme hızının gözlenmesi, birden fazla mikobakteri türü ile oluşan enfeksiyonların fark edilmesi ve sıvı besiyeri kültürleri kontamine olduğu zaman yedek olarak kullanılması olarak sıralanabilir (7).

2.5.3.1. Katı Besiyeri

Katı özellikteki besiyerleri yumurta bazlı ve agar bazlı olarak iki şekildedir.

Yumurta Bazlı Besiyeri

Mikobakteriyel olmayan mikroorganizmanın inhibitörü olarak malakit yeşili içeren Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri en yaygın kullanılan katı besiyeridir. Özellikle balgam kültürü için yumurta bazlı ortam kullanılır. LJ kullanıcı tarafından hazırlanabilir veya ticari olarak elde edilebilir. Gliserol içeren LJ, *M. tuberculosis* büyümesini desteklerken, gliserol içermeyen ancak sodyum içeren LJ, *M. bovis* büyümesini artırır. Buharlaşma ve kontaminasyon ihtimalini en aza indirmek için tüp kapakları sıkıca kapatılarak buzdolabında birkaç ay saklanabilir (66).

Agar Bazlı Besiyeri

Bu besiyerleri eğik tüplerde hazırlanır ve kontaminasyon ihtimali yumurta bazlı besiyerinden daha azdır. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en sık kullanılan agar bazlı besiyerleridir ve genellikle laboratuvar da ticari olarak hazırlanır. Şeffaf bir besiyeridir. İnkübasyondan bir hafta sonra mikroskop yardımıyla koloniler saptanabilir (66).

2.5.3.2. Sıvı Besiyeri

Sıvı besiyerleri katı besiyerlerine göre önemli bir zaman avantajı sağlar. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri 7-14 günde sonuç verebilmesine karşın , Middlebrook 7H11 agarda 18-28 gün veya LJ besiyerinde 21-42 gün gibi süreler gerekebilmektedir. Ancak uzun süre saklanamamaları, maliyetlerinin uygun olmaması ve koloni morfolojilerinin görülememesi dezavantajlarıdır (60).

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerisine göre mikobakterilerin birincil izolasyonunda sıvı besiyerleri ile katı besiyerleri beraber kullanılmalıdır (67).

Hazır Kültür Sistemleri

Tüberkülozun tanısında rutinde hızlı kültür yöntemleri de kullanılmaktadır. Bu sistemlerde hızlı mikobakteri üremesi sağlanmakta iken mikobakteri izolasyon şansı da artmaktadır (68).

Hızlı tanı sistemlerinde genellikle gaz basıncındaki farklılıklar, oksijen harcaması ile karbondioksit üretimi baz alınarak ölçüm yapılır. Bu sistemlerden bazıları; BACTEC 460 TB, BACTEC MGIT 960, BacT/ALERT 3D dir.

Hızlı kültür sistemlerinden biri olan yarı otomatize Bactec 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık testlerinin uygulandığı bir sistemdir ve uzun yıllardır rutin tanıda kullanılmaktadır. VersaTREK (ESP Culture System- Trek Diagnostics, Inc., Westlake Ohio), MB/Bact T (bioMerieux, Hazelwood, Mo.) , Bactec 9000 MB (BD Biosciences, Sparks, MD) ve Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD Biosciences, Sparks, MD) mikobakterilerin tanısı için geliştirilmiş tam otomatize sistemlerdir (69).

2.5.4. Biyokimyasal Testler

2.5.4.1. Niasin Testi

Niasin ribonükleotid tüm mikobakterilerde üretilir ancak bazı mikobakteriler (*M. tuberculosis*, *M. simiae*, *M. chelonae*' nın bazı suşları gibi) niasini, nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) dönüştürecek enzimi bulundurmaz (70).

Bu test *M. tuberculosis* ile bazı *M. simiae* ve *M. chelonae* izolatlarının, besiyerinde niasin birikimine sebep olmaları ve bu niasinin çeşitli kimyasallarla ortaya çıkarılmasıyla gerçekleştirilir. Niasin testi ısıya stabil katalaz testi ve nitrat testiyle desteklenmelidir (8).

2.5.4.2. Katalaz Testi

Mikobakterilerde katalaz enzimi varlığını araştırmak için yapılır. Katalaz enzimi hidrojen peroksidi (H_2O_2) su (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalar. Oksijenin oluşumu hava kabarcıklarının açığa çıkmasıyla belli olur. Kümeli mikobakterilerin birbirlerinden uzaklaşmalarını ve bulundurdıkları enzimin ortaya çıkmasını sağlamak için test Tween 80 ile kullanılır (8).

Biri semikantitatif test diğeri ısıya stabil katalaz testi olmak üzere iki test uygulanır. Semikantitatif test mikobakterileri, hava kabarcıklarının yüksekliğinin 45mm altında veya üstünde olmasına göre değerlendirilerek düşük katalaz reaksiyonu oluşturanlar ve yüksek katalaz reaksiyonu oluşturanlar olmak üzere iki gruba ayırır (71). Isı tolerans testinde, bazı katalaz enzimi çeşitleri 68°C' de 20 dakika ısıya maruz bırakıldığında etkinliğini kaybeder. Enzimin sıcaklık yardımıyla inaktive edilmesi bazı mikobakteri türlerinin ayırt edilmesinde değerli bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır (50).

2.5.4.3. Pirazinamidaz Testi

pncA geni tarafından kodlanan pirazinamidaz enziminin etkin olabilmesi için aktif forma dönüşmesi gerekmektedir (72).

Pirazinamidaz enzimi pirazinimidi pirazinoikası ve amonyağa ayrıştırır. Ortama eklenen kimyasallarla pirozinamik asit tespit edilir. Bu test ile *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare* ve *M. marinum* pozitif sonuç verirken, *M. bovis* ile *M. kansasii* negatif sonuç vermektedir (29).

2.5.4.4. Üreaz Testi

Mikobakterilerin üreyi amonyak ve CO₂'e çevirebilme özelliği skotokromojen ve kromojen olmayanlarının tanımlanmasında yardımcı olabilir. *Mycobacterium scrofulaceum* üreaz pozitif iken, *M. avium* ve *M. intracellulare* üreaz negatiftir. Üreaz testi özellikle pigment oluşturabilen *M. avium* suşlarının tanımlanmasında faydalıdır (29).

2.5.4.5. Macconkey Agarda Üreme Testi

Sadece *M. fortuitum* ile *M. chelonae* MacConkey agarda üreme gösterdiğinden bu iki türün diğer mikobakterilerden ayrılmasını sağlar (29).

2.5.4.6. Nitrat Redüksiyon Testi

Mikobakteriler tarafından nitratin nitrite nitroredüktaz enzimiyle indirgenmesi özelliğinden faydalanılan testtir. Nitrat redüksiyonu testi; koloni morfolojisi, üreme hızı ve pigment üretme özellikleri benzer mikobakterileri birbirinden ayırmada kullanılır. *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, bazı saprofit nonkromojenler, *M. smegmatis* ve *M. fortuitum* grubu nitrat redüktaz pozitifdir (8).

2.5.4.7. Tween 80 Hidroliz Testi

Yavaş üreyen TDM türlerinin ayırımında kullanılır. Bazı mikobakteri türlerinin ürettiği lipaz enzimi Tween 80 deterjanına etki ederek hidroliz eder ve ona bağlı olan nötral kırmızısı da ayrılmış olur. Besiyeri kırmızı renge döner bu şekilde tanımlama yapılır (71).

2.5.5. Moleküler Testler

Klasik tanı yöntemleri günümüzde rutin çalışmalarda hala kullanılıyor olmakla birlikte, duyarlılık ve özgülüklerinin düşük olması ve uzun sürmeleri gibi nedenler yüzünden moleküler yöntemlere ihtiyaç kaçınılmazdır. Moleküler yöntemler klinik örneklerde tanı süresinin kısalması, etkenin tür düzeyinde tanımlanması, tiplendirilmesi, ilaç direncinin ortaya konmasında kullanılmaktadır (73). Mikobakterilerin moleküler tanısında birçok yöntem kullanılmaktadır.

2.5.5.1. MALDI-TOF MS (Kütle Spektrometresi)

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) yöntemi ile bakteri genomundaki protein dizilimleri ortaya çıkarılarak bakteri tanımlaması yapılabilmektedir. Bakterilerin tanımlanmasında MALDITOF MS kullanımını ilk ortaya atan 1975 yılında Anhalt ve Fenselau olmuştur (74).

2.5.5.2. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri

Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinden olan ve DSÖ tarafından tavsiye edilen Xpert MTB/RIF testi, tanı amaçlı kullanılan ve moleküler laboratuvara ihtiyaç duyulmayan bir testtir. TB için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir (19).

Nükleik asit yöntemlerinden Transkripsiyona Bağlı Çoğaltma (Transcription Mediated Amplification (TMA) yönteminde çoğaltılması hedeflenen nükleik asit ribozomal RNA'dır. Test tek tüpte gerçekleştirildiğinden kontaminasyon riski azdır. Aynı zamanda ısı döngü cihazı gerektirmemesi ve 2 saat gibi bir sürede sonlanması da testin avantajlarından (75).

Line prob teknolojileri de TDM'lerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. "internal transcribed spacer" (ITS) gen bölgesini hedef alan INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics N.V., Zwijndrecht, Belgium) ve 23S rRNA genini hedef alan GenoType Mycobacteria CM/AS (CM, common mycobacteria; AS, additional species), (Hain Lifescience GmbH, Nehren Germany) ters hibridizasyon testleri rutin olarak kullanılmaktadır (76).

Zincir ayrıştırma amplifikasyon (strand displacement amplification=SDA) yönteminde 16S rRNA geniyle çalışılmaktadır. Bu testin özgüllüğü %85–94 arasında bulunmuştur.

2.5.5.3. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi yöntemi mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında güvenilir bir yöntemdir. Ancak uygulamalarında zorluklar mevcuttur. Yöntemin hızlı ve kesin sonuçlarına karşın yüksek maliyeti dezavantajıdır (77). Bu yöntemde değişken genomik bölgelerin DNA dizilimi, mikobakterilerin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlarken, bu yöntem henüz kaynağı kısıtlı ülkelerde rutinde kullanıma uygun değildir. DNA sekanslama yöntemleri, türe özgü nükleotit sekanslarının belirlenmesine dayanır. Bunlar daha sonra kurum içi veya ticari olarak temin edilebilen veritabanlarından bilinen kalite kontrollü sekanslarla karşılaştırılır (78). Bu deneyler, bir ya da daha fazla genin amplifikasyonuna dayanmaktadır (16S rRNA

genleri, *rpoB*, *gyrB*, *hsp65*, *secA1*, 32-kDa 'lık proteini ya da 16S-23S rRNA gen aralığı). Otomatik sıralayıcılar ve tecrübeli personel gerektiren sistemde uygun koşullar altında sekanslama 1-3 gün içinde sonuçlandırılabilir (79).

2.5.5.4. Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis

“Single-stranded conformation polymorphism analysis” (SSCP) yöntemi, mikobakterilerin identifikasyonunda DNA dizilerindeki farklılıkları araştıran bir yöntemdir. Yöntem farklı genomik varyantları tanımlamaya olanak sağlar. Bu yöntem mutasyonların hızlı analizi için tercih edilir ve yöntemde istenen genin PCR ile çoğaltılmış küçük dizileri kullanılır. Bu çoğaltılmış dizilerin denatüre edilmesi ile önce tek zincirler elde edilir. Tek zincirler renatüre edilir. Bu esnada ayrı dizilerdeki parçalar değişik tersiyer konformasyonlar oluştururlar. Elektroforez sırasında ikincil ve üçüncül yapıların oluşumuna rastlanır. Bu parçalar elektroforez ile ayrıştırıldığında, parçaların farklı hızlarla hareket ettiği görülür. Bu yöntemle PCR sonrasında SSCP analizi sonucu kısa sürede alınabilmekte, aynı anda çok sayıda örnek test edilebilmektedir. Hızlı bir yöntemdir (80).

2.5.5.5. DNA Microarray

Bu teknoloji, birbirine komplementer dizilerin hibridizasyonu ve görüntülenmesini temel alır. Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında ve ilaç direnci saptanmasında kullanılabilir. TB tanısıyla ilgili kullanımı henüz araştırma aşamasındadır. Ancak ilaç direnci üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda dizi analizi ile uyumlu sonuçları rapor edilmiştir (81).

2.5.5.6. Pirosekanslama

Pirosekanslama (Biotage, Upsala, İsveç) DNA yapımı sırasında pirofosfat (PPi) salınımını ortaya koyan yarı otomatize bir DNA dizileme tekniğidir. Oluşan enzimatik tepkime ışık olarak açığa çıkmakta ve bu ışık luminometrik olarak ölçülebilmektedir. Açığa çıkan ışığın miktarı bağlanan nükleotidlerin sayısı ile orantılıdır (82).

2.5.5.7. Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) diğer adıyla PCR-REA (Restriksiyon enzim analizi) (PRA) yöntemi ilk olarak 1992 yılında Plikaytis ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (83).

Bu yöntemle mikobakterilerin tiplendirilmesinin kısa sürede gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Yöntemde en fazla kullanılan gen bölgeleri *hsp65*, *rpoB*, 16S rDNA bölgeleridir ve yöntemin temeli bu bölgelerin restriksiyon enzimleriyle kesimlerine dayanmaktadır (82). Bu yöntem tüm mikobakteriler için ortak olan primerlerin PCR ile

çoğaltılması sonucunda elde edilen ürünlerin restriksiyon enzimleri yardımıyla kesilmesi ve elektroforezde görüntülenmesi temeline dayanır (84).

Restriksiyon enzimleri gerekli olan DNA moleküllerinin hassas ve tekrar edilebilir şekilde kesilmesini sağlar. Gen klonlamada kullanılan çeşitleri tip II restriksiyon endonükleazlardır ve bu enzimlerin temel özelliği her bir enzimin DNA molekülünü kestiği spesifik bir tanıma dizisine sahip olmasıdır (85).

Yüksek ayırım gücü ve tekrarlanabilirliğinden dolayı bu yöntem son 15 yılda yaygın olarak kullanılmıştır (66).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Etüv 37C ° (Termal)
Buzdolabı (Arçelik)
Derin Dondurucu (Nüve)
Otoklav (Thermal)
Vorteks karıştırıcı (VSM-3)
Mini Santrifüj (İsolab)
Santrifüj (İsolab)
Hassas terazi (BEL)
Biyolojik kabin (Bilser Class II)
Termal Döngü Cihazı (Labnet)
Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı (Major Science)
UV görüntüleyici
Su banyosu (Termal)
Çalkalayıp ısıtıcı (Benchmark)
Cryovial Tüp (2 ml)
Cam boncuk
PCR tüp (0.5 mL -1,5 ml)
Otomatik Pipetler (10-100-1000 µl) (İsolab)
Pipet ucu (1-20-1000 µL)

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Löwenstein-Jensen Besiyeri

3.1.3. Kimyasal Maddeler

Alkol
Çamaşır suyu
Agarose (sigma)
Tris (sigma)
Borik Asit (merck)
EDTA (sigma)
Etidyum bromür (Thermo Scientific)
Asetik asit (merck)

Kullanılan çözeltiler;**Agaroz jel:**

2 gr agaroz (sigma)

100 ml 1x TBE Buffer

Erlen içerisine 2 gram agaroz tartıldıktan sonra üzeri 100 ml TBE ile tamamlanarak mikrodalga fırında orta sıcaklıkta 4 dakika bekletilerek eritildi.

10 X TBE Buffer (500 ml):

54 gr. Tris

27,5 gr Borik asit

3,7 gr. EDTA

10 gr NaOH

Tartılıp karıştırılarak eritildi, pH:8 'e ayarlandı

0,5 M EDTA:

3,724 gram EDTA

EDTA tartıldı. Üzeri 20 ml'ye tamamlandı.ph:8 'e ayarlandı.

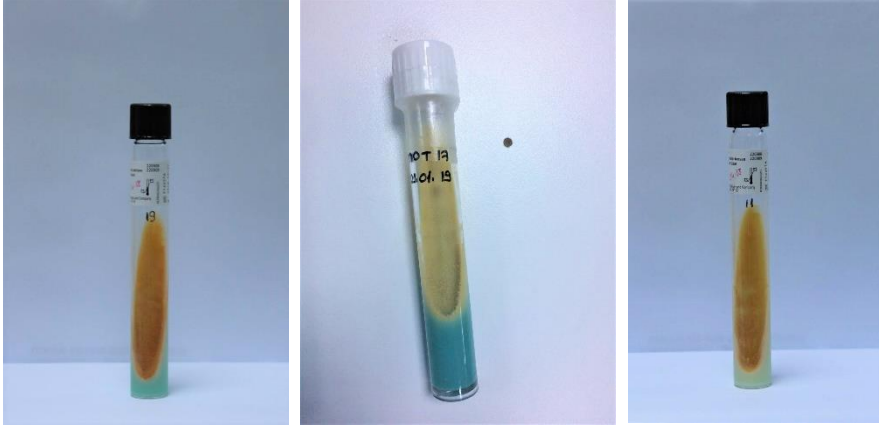
Etidyum Bromür:

5mg etidyum bromüd 1 ml distile su ile karıştırıldı.

Kullanılan agaroz jel miktarına göre her jele 15-18 µl uygulandı.

3.2. Yöntemler**3.2.1. Bakteri İzolatları**

Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi'nden gönüllülük esasına dayalı olarak temin edilen 34 adet TDM izolatının ve 14 adet referans suşun Löwenstein Jensen besiyerlerine ekimi yapıldı. Haftada iki kez üreme kontrolleri yapılarak üreme zamanları ve koloni morfolojileri kaydedildi. (Şekil 5)



Şekil 5: Lowenstein Jensen besiyerinde üreme

3.2.2. DNA İzolasyonu

Kültürde üretilmiş örneklerden DNA izolasyonu kaynatma yöntemiyle yapıldı (86). 1 ml steril distile su içeren mikrosantrifüj tüp içerisine LJ besiyerinde üretilmiş bakteri kolonilerinden bir öze dolusu alınarak süspansiyon haline getirildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 2.000xg'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atıldı. 500 µl TE tamponu (10mM Tris (pH: 8.0) 1 mM EDTA) eklendi. 2.000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı. Üzerine 300 µl TE tamponu eklendi. 2.000xg'de 20 dakika santrifüjün ardından süpernatant kısım atıldı. 250µL steril distile su eklendi. Kaynar su banyosunda 20 dakika bekletilerek bakterilerin parçalanıp, DNA'nın açığa çıkması sağlandı. 2.000xg'de 20 dakika santrifüj edilerek, bakteri artıklarının çökmesi sağlandı. Kalıp DNA' yı içeren süpernatant kısım alınarak steril tüp içerisine konuldu. Örnekler kullanılıncaya kadar -40°C'de saklandı.

3.2.3. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin hsp65 Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

TDM DNA'ları hsp65 gen bölgelerinden PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi için kullanılan 50 µl PCR reaksiyon karışımı (10Xbuffer 5µl, 25 mM MgCl₂ 5µl, dNTP 1µl, Primer Tb11(5-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) 0,5µl, primer Tb12 (5-CTTGTCGAACCGCATACCCT) 0,5µl, taq polimeraz ,0,2µl dH₂O) hazırlandıktan sonra tüplere 40 µl olacak şekilde dağıtıldı. (Tablo 3) Üzerlerine 10'ar µl izole edilen örnek DNA'ları eklendi. Karışımın eklendiği reaksiyon tüpleri Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek 44 döngü (94 C° de 3 dakika, 94°C'de 1 dakika 58 C° 'de 1 dakika 72C° 'de 1 dakika 30 saniye 72C°'de 4 dakika) reaksiyon koşullarına göre amplifikasyon

gerçekleştirildi. (Tablo 4) Döngü tamamlandıktan sonra amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek 441 bp uzunluklar doğrulandı.

Tablo 3: PCR Reaksiyon Karışımı

	μ l'deki hacim	10 örnek için hacim
Distile su dH₂O	27,8	278
MgCl₂	5	50
dNTP	1	10
10xBuffer	5	50
Primer I	0,5	5
Primer II	0,5	5
Taq polimeraz	0,2	2
DNA miktarı	10	-
Toplam Hacim	50	400

Tablo 4: PCR Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık	Süre
94 C°	3 dakika
94 C°	1 dakika
58 C°	1 dakika
72 C°	1 dakika 30 saniye
72C°	4 dakika

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen ürün %2 agaroz jelde 1xTBE yükleme tamponu eklenerek güç kaynağına bağlandı (Major Science) ve 90 V'da 1 saat yürütüldü. Transilüminatörle bantlar gözlemlendikten sonra görüntüler kaydedildi.

3.2.5. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi

Enzim kesimi için BstEII ve HaEIII enzimleri kullanılarak karışım hazırlandı. Her iki enzim için ayrı ayrı hazırlanan karışımlara çalışılacak her örnek için 2 μ l enzim tamponu, 1 μ l enzim konuldu. Hazırlanan karışım tüplere dağıtıldı. Tüplerin üzerlerine 10 μ l PCR ürünü eklendi. Karışımlar bir gece 37C°de bekletildi.

BstEII stok solüsyonu:

BstEII enzimi 1 µl
 Buffer 2 µl
 PCR ürünü 10 µl

HaEIII stok solüsyonu:

HaEIII enzimi 1 µl
 Buffer 2 µl
 PCR ürünü 10 µl

3.2.6. Enzim Kesimi Sonrasında DNA Fragmanlarının Değerlendirilmesi

Enzim kesim işleminden sonra TİBO jel (Tanısal İnovatif Biyoteknoloji Organizasyonu, İstanbul) Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ' den temin edilmiştir. Jel üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı (<http://www.tibobio.org/>).

Yükleme taponu olarak 10XTAE tamponu kullanıldı. 3µl SYBR gold 15µl enzim kesim ürünüyle karıştırılarak yüklendi. Jel ORTE (Observable Real-Time Electrophoresis, TİBO, İstanbul) cihazına yüklendi. 45 dakika 100 Voltta sürekli izleme ve 5 dakikada bir görüntü kaydı yapılarak yürütme tamamlandı. Her yürütmede uygun belirteçler ve kontrol suş olarak *M. tuberculosis* H37Ra kullanıldı. Elde edilen sonuçlar çeşitli kaynaklardan oluşturulan referans algoritmayla (Tablo 5) değerlendirildi (87)(88)(89)(84)(90).

Tablo 5: Restriksiyon Enzim Kesim Bölgelerine Göre Mikobakteri Tür Tanımlama Cetveli

BstEII	HaEIII	Mikobakteri Türü
440 (442/ Kesim Yok)	195 /90/60	<i>M.confuentis I</i>
	180/145	<i>M.gilvum I</i>
	175/90/60 (190/80/60)	<i>M.gadium I</i>
	175/90	<i>M.tusciae I</i>
	175/85/60	<i>M.gallinarum I</i>
	170/130 (180/140)	<i>M.triviale I</i>
	160/90/60	<i>M.vaccae I</i>
	160/85/55	<i>M.flavescens III</i>
	145/130	<i>M.simiae V</i>
	145/130	<i>M.florentinum I</i>
	145/130 (150/130)	<i>M.lentiflavum I</i>
	145/90/60 (160/80/60)	<i>M.parafortuitum I</i>
	145/90/60/50	<i>M.komossense I</i>
	145/70/60/55	<i>M.brumae I</i>
	140/100/60/50	<i>M.holsaticum I</i>
	140/60/50	<i>M.novocastrense I</i>
	140/55/50	<i>M.flavescens I</i>
	135/130/65 (140/80/70)	<i>M.duvalii I</i>

	130/115/70/60	<i>M.aurum II</i>
	130/105/70 (140/105/70)	<i>M.szulgai I</i>
	125/105/60	<i>M.nebraskense I</i>

BstEII	HaEIII	Mikobakteri Türü
320/130 (325/140)	265/130	<i>M.leprae I</i>
	200/70/60/55	<i>M.immunogenum II</i>
	200/70/60	<i>M.aichiense I</i>
	200/60/55/50 (210)	<i>M.chelonae I</i>
	160/110 (175)	<i>M.haemophilum I</i>
	145/70/60/55 (160/170)	<i>M.immunogenum I</i>
	140/130/50	<i>M.elephantis I</i>
	140/95/80	<i>M.cosmeticum I</i>
	140/90/80	<i>M.canariasense I</i>
	140/65/60 (155/85)	<i>M.mucogenicum I</i>
	130/115/60/50	<i>M.botniense I</i>
	125/95/80	<i>M.lacus I</i>
	130/60	<i>M.gordonae</i>
320/115 (325/115)	245/140	<i>M.fluoranthenvivorans I</i>
	195/70/60/50	<i>M.aichiense I</i>
	185/145	<i>M.fallax I</i>
	185/140	<i>M.terrae II</i>
	180/160/55	<i>M.frederiksbergense I</i>
	180/130 (190/140)	<i>M.terrae I</i>
	175/90/60	<i>M.sphagni I</i>
	170/140 (180/150)	<i>M.neoaurum I</i>
	170/140	<i>M.parafortuitum II</i>
	160/125/60 (175/120/60)	<i>M.rhodesiae I</i>
	145/140/60 (190/140)	<i>M.diernhoferi I</i>
	145/130/60	<i>M.monteflorense I</i>
	145/130 (150/130)	<i>M.lentiflavum II</i>
	145/130	<i>M.simiae IV</i>
	145/130/50	<i>M.triplex I</i>
	145/80/60	<i>M.aubagnense I</i>
	145/75/60	<i>M.arupense I</i>
	145/65/60	<i>M.mucogenicum II</i>
	145/65/60	<i>M.phocaicum I</i>
	145	<i>M.cookii I</i>
	140/135/50	<i>M.pulveris I</i>
	140/80/60 (155/85/60)	<i>M.chitae I</i>
	140/90/60 (155/85)	<i>M.mucogenicum III</i>
	140/90/60	<i>M.nonchromogenicum II</i>
	140/60/50	<i>M.terrae III</i>
	130/115/60 (140/115/65)	<i>M.gordonae IV</i>
	130/110/70/60	<i>M.gordonae VIII</i>
	130/110/70	<i>M.kumamotonense I</i>
	130/95/75/60 (140/100/80)	<i>M.kansasii V</i>

125/105 (140/105)	<i>M.genavense I</i>
140/65/60	<i>M.chelonae II</i>

BstEII	HaEIII	Mikobakteri Türü
235/210 (245/220)	225/110	<i>M.shotsii I</i>
	200/90/60	<i>M.moriokaense I</i>
	200/70/60/50 (210/70)	<i>M.abscessus II</i>
	200/70/60/50	<i>M.bolletii I</i>
	200/70/60/50	<i>M.massiliense I</i>
	190/105/80	<i>M.ulcerans II</i>
	185/130	<i>M.genavense II</i>
	185/130 (200/135)	<i>M.simiae I</i>
	180/135/70/50	<i>M.thermorresistibile I</i>
	180/100/50	<i>M.hassiacum I</i>
	160/95/50	<i>M.poriferae I</i>
	160/60/50 (180/60/55)	<i>M.austroafricanum I</i>
	160/60/50	<i>M.vanbaalenii I</i>
	155/140	<i>M.simiae II</i>
	145/140/100/50	<i>M.peregrinum I</i>
	145/140/75	<i>M.parascrofulaceum V</i>
	145/130/95	<i>M.scrofulaceum I</i>
	145/130/60	<i>M.parmense I</i>
	145/130	<i>M.avium s. avium III</i>
	145/130	<i>M.interjectum I</i>
	145/130	<i>M.intermedium I</i>
	145/130	<i>M.intracellulare III</i>
	145/130	<i>M.saskatchewanense I</i>
	145/130	<i>M.seoulense I</i>
	145/130	<i>M.simiae VI</i>
	145/110/80	<i>M.pseudoschottsii I</i>
	145/105/80	<i>M.malmoense II</i>
	145/105/80 (160/115/80)	<i>M.marinum I</i>
	145/105/80 (200/115/80)	<i>M.ulcerans I</i>
	145/105	<i>M.bohemicum I</i>
	145/70/60/55 (160/70)	<i>M.abscessus I</i>
	145/125/100/50 (155/150/100)	<i>M.peregrinum II</i>
	140/125/100/50 (150/125/100)	<i>M.porcinum I</i>
	140/125/100/50	<i>M.septicum I</i>
	140/125/60/50	<i>M.boenickei I</i>
	140/125/60/50	<i>M.senegalense III</i>
	140/115/70	<i>M.terrae IV</i>
	140/105/80	<i>M.intracellulare II</i>
	140/100/60	<i>M.kubicae I</i>
	140/90/60	<i>M.chlorophenolicum I</i>
	140/90/60/55 (150/80/60)	<i>M.chubuense I</i>

140/90/60	<i>M.conspicuum I</i>
140/90/60	<i>M.obuense I</i>
140/80/60/50 (150/80)	<i>M.phlei I</i>
130/115	<i>M.gordonae V</i>
130/115	<i>M.heidelbergense I</i>
130/115	<i>M.interjectum II</i>
130/105/80/60	<i>M.branderi I</i>
130/105/80	<i>M.kansasii I</i>
130/105/60	<i>M.avium s. avium II</i>
130/105/60	<i>M.colombiense I</i>
130/105	<i>M.avium s.avium I</i>
130/105	<i>M.avium s. paratuberculosis I</i>
130/105	<i>M.avium s. silvaticum I</i>
130/95/80	<i>M.parascrofulaceum III</i>
130/95	<i>M.palustre I</i>
130/80/60	<i>M.celatum I</i>
120/115/110	<i>M.intracellulare IV</i>
115/105	<i>M.asiaticum I</i>

BstEII	HaEIII	Mikobakteri Türü
	180/160	<i>M.doricum I</i>
	175/80	<i>M.aurum I</i>
	160/145/60	<i>M.agri I</i>
	160/90/60	<i>M.monacense I</i>
	145/140/100/60	<i>M.peregrinum III</i>
	145/130	<i>M.simiae III</i>
	145/125/60	<i>M.goodii I</i>
	145/125/60 (145/100/50)	<i>M.mageritense I</i>
	145/125/60 (160/130/60)	<i>M.smegmatis I</i>
	145/100/50	<i>M.alvei I</i>
	145/80/60	<i>M.murale I</i>
	145/125/60/50	<i>M.senegalense II</i>
	145/125/60	<i>M.wolinski I</i>
	140/120/95 (160/90/60)	<i>M.gordonae VI</i>
	140/105/70	<i>M.shimodoi I</i>
	140/80/60	<i>M.hodleri I</i>
	140/80/60 (150/80/60)	<i>M.tokaiense I</i>
	130/105/80	<i>M.celatum II</i>
	130/105/70 (140/105/70)	<i>M.gastri I</i>
	130/105/70	<i>M.kansasii VI</i>
	130/105 (140/105)	<i>M.kansasii II</i>
	130/95/70	<i>M.kansasii III</i>
	130/95	<i>M.parascrofulaceum IV</i>
	150/110/70	<i>M.shimodei I</i>

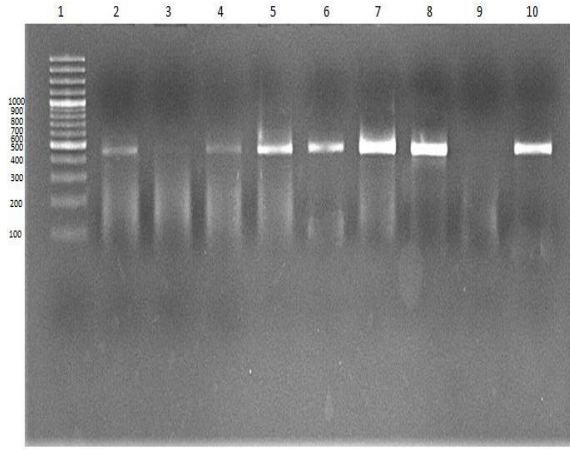
235/130/85
(245/140/85)

BstEII	HaEIII	Mikobakteri Türü
235/120/100 (245/115/100)	160/115/60	<i>M.gordonae IX</i>
	160/105/60	<i>M.heckeshornense I</i>
	155/110	<i>M.gordonae VII</i>
	145/130/60	<i>M.chimaera I</i>
	145/130/60	<i>M.intracellulare I</i>
	145/130	<i>M.lentiflavum III</i>
	145/105/80	<i>M.malmoense I</i>
	140/125/100	<i>M.brisbanense I</i>
	140/160 (150/65)	<i>M.hibemiae I</i>
	130/115 (170/115) – (140/120)	<i>M.gordonae III</i>
	130/110/95	<i>M.gordonae X</i>
	145/140/100/55	<i>M.fortuitum</i>
235/120/85 (245/115/80)	215/110 (235/115)	<i>M.gordonae II</i>
	180/140/50	<i>M.senegalense IV</i>
	160/115/60 (170/115/60) (160/90/60)	<i>M.gordonae I</i>
	160/105/60 (170/105/60)	<i>M.xenopi I</i>
	150/130/70 (160/140/70)	<i>M.tuberculosis complex I</i>
	145/130	<i>M.sherrisii I</i>
	145/120/60/55 (155/135)	<i>M.fortuitum I</i>
	145/120/60/55	<i>M.fortuitum acetamydolyticum I</i>
	145/60/55 (160)	<i>M.nonchromogenicum I</i>
	140/125/60/55	<i>M.conceptionense I</i>
	140/125/60/55	<i>M.farcinogenes I</i>
	140/125/60/50	<i>M.houstonense I</i>
	140/125/60/50	<i>M.neworleanense I</i>
	140/125/60/50 (200/150)	<i>M.senegalense I</i>
	140/125/60/55 (150/135/60/55) (140/120/100/55)	<i>M.fortuitum II</i>
	140/95	<i>M.parascrofulaceum I</i>
	135/90/85	<i>M.fortuitum III</i>
	130/115/75/60 (140/115/70)	<i>M.kansasii IV</i>
	130/90	<i>M.gordonae</i>
235/120/85 (245/115/80)	130/95	<i>M.lentiflavum IV</i>
	130/95	<i>M.parascrofulaceum II</i>

4. BULGULAR

Bu çalışmada Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi'nden (Dr. İsmail Ceyhan) gönüllülük esasına dayalı olarak temin edilen solunum yolu örneklerinden(balgam) soyutlanan 34 adet TDM izolatu ve 14 adet referans suş değerlendirmeye alındı. Çalışmaya dahil edilen 34 örnekten 30'u (% 88,24) tür düzeyinde tanımlandı.

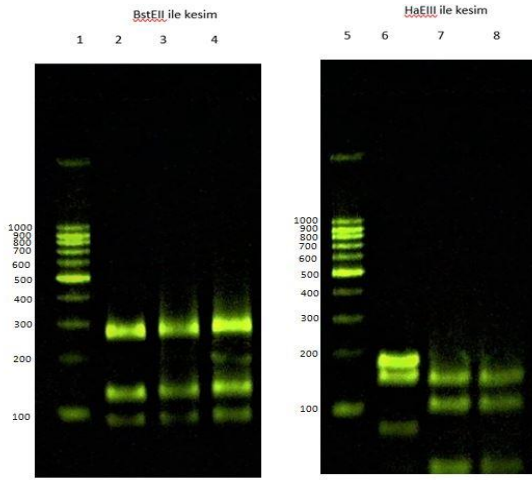
Çalışmamızda tüm adımlar belirtildiği şekilde uygulandı. PCR standardizasyonu sağlanarak hem incelenecek bakteri suşları hem referans suşlar için elde etmek istediğimiz hsp65 gen bölgesinin 441 bp'lik PCR ürünleri görüntülendi. (Şekil 6)



Şekil 6: TDM'lerden elde edilen PCR bant görünüşleri

1) Marker 2) pozitif kontrol 3) negatif kontrol 4-10. kuyular, sırasıyla; 47,48,52,53,54,55 numaralı çalışma örnekleri (beklenen bant büyüklüğü: 441 bp.).

Çoğaltılan ürünlere enzim kesim prosedürü uygulandı. Son ürünler TİBO (Tanısal İnovatif Biyoteknoloji Organizasyonu,İstanbul) jelde görüntülendi. (Şekil 7)



Şekil 7: Enzim Kesim Görüntüleri

Marker, BstEII ile yapılan kesimler, marker, HaeIII ile yapılan kesimler.

Değerlendirmeler sonucunda çalışmamızda kullanılan 34 izolattan TDM'lerin tür dağılımı; %23,52(8/34) *M. intracellulare*, %17,64 (6/34) *M. gordonae*, %17,64 (6/34) *M. abscessus*, %17,64 (6/34) *M. simiae*, %5,88 (2/34) *M. lentiflavum*, %2,94 (1/34) *M. kansasii*, %2,94 (1/34) *M. scrofulaceum* olarak belirlendi. (Tablo 6) Örneklerden 4 tanesi (4/34- %11,76) değerlendirilememiştir. Kontrol amaçlı kullanılan 14 referans suş (*M. duvalii*, *M. aichense*, *M. vaccae*, *M. diernhoferi*, *M. terrae*, *M. kansasii*, *M. austroafricanum*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. senegalense*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. gordonae*, H37 Ra) doğru şekilde değerlendirilmiştir.

Tablo 6: Çalışmamızda Kullanılan TDM 'lerin Tür Dağılımı

Türler	Sayı (%)
<i>M. intracellulare</i>	8(23,52)
<i>M. simiae</i>	6(17,64)
<i>M. abscessus</i>	6(17,64)
<i>M. gordonae</i>	6(17,64)
<i>M. lentiflavum</i>	2(5,88)
<i>M. kansasii</i>	1(2,94)
<i>M. scrofulaceum</i>	1(2,94)
Değerlendirilemedi	4(11,76)
Toplam Örnek Sayısı	34(100)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çoklu ilaca dirençli tüberküloz suşlarının artışı ve tüberkülozun önemini kaybetmeyen bir hastalık olması mikobakterilerin tanımlanmasında hızlı yöntemlere duyulan ihtiyacı arttırmıştır (91).

Aynı zamanda TDM'lerden kaynaklanan enfeksiyonlar son yıllarda artış göstermiştir. Özellikle hızlı üreyen türlerin uzun zamandır patojenik olmadığı düşünülmektedir. Ancak son yıllarda, sıklıkla kemik ve eklemlerde, yumuşak dokuda, akciğerde hastalıktan sorumlu olduğu bildirilmiştir (92). Hastalığa duyarlılıkta patojenite ve konağın immün sistemi arasındaki etkileşim önemli rol oynamaktadır. Yaşlılık, immün yetmezlik, akciğer hastalıkları TDM enfeksiyonları riskini arttırmaktadır.

Leber ve Marras tarafından yapılan çalışmada TDM'lerin sebep olduğu hastalıklarda ilaç tercihlerinin tedavi maliyetlerini etkilediğine değinilmiştir(93). TDM'lerin tiplendirilmesi; doğru ilaç kullanımı ve etkili bir tedavi ile gereksiz maliyetin önlenmesi açısından da önemlidir.

Mikobakterilerin tiplendirilmesinde standardize edilmiş pek çok ticari yöntem bulunmaktadır. (MALDI-TOFF, INNO-LİPA, DNA dizi analizi vb.) Ancak bu yöntemlerin tür tanımlamasında yetersiz kalması, rutinde kullanım için pahalı olması gibi sınırlılıkları mevcuttur. Bu nedenle PCR-RFLP; tanı algoritmasının geniş olması ve basit PCR teknikleriyle yapılabilmesi nedeniyle ticari bağımlılığı nispeten azaltan, kısa sürede sonuç alınabilen tür tanımlama yöntemidir.

Çalışmamızda kullanılan mikobakteri izolatlarından en yaygın olarak saptanan türlerin *M. intracellulare*, *M. abscessus* ve *M. simiae* olduğu tespit edilmiştir. Kim ve Rheem'in 2013 yılında solunum örnekleriyle Kore'de PCR-RFLP yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada *Mycobacterium avium complex*, *M. kansasii* en sık rastlanan mikobakteri türleri olmuştur (94). Nour-Neamatollahie ve arkadaşları tarafından 2017 yılında 59 TDM izolatı (56 solunum yolu örneği, 3 solunum dışı örnek) arasında PCR-RFLP ile yapılan tür tayininde *M. kansasii* ve *M. simiae* en çok rastlanan türler olmuştur (95). Çalışmamızda *M. simiae* en sık rastlanan türlerden biridir. Appak ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada solunum yolu örneklerinden izole edilen türlerde PCR-RFLP ve DNA Dizi Analizi yöntemlerini karşılaştırdıkları ve iki yöntemde ortak olarak *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium fortuitum* ve *Mycobacterium peregrinum* türlerine en yüksek oranda rastlandığı belirtilmiştir (96). Çalışmamızla *M. abscessus*'un sık görülmesi yönünden uyumludur ancak bu

çalışmada yüksek oranda görülen *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium fortuitum* ve *Mycobacterium peregrinum* 'a bizim çalışmamızda rastlanmamıştır. Nasiri ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada TDM olarak izole edilen örnekler arasında hsp65-PRA kullanarak yaptıkları tür düzeyinde tanımlama sonucunda en yüksek oranda *M. simiae*, *M. kansasii* ve *M. fortuitum* türlerine rastladıklarını belirtmişlerdir (97). Mortazavi ve arkadaşları tarafından 2019 yılında İran'da solunum örneklerinden izole edilen TDM'lerle yapılan bir çalışmada en sık rastlanan türlerin; *M. fortuitum*, *M. simiae* ve *M. kansasii* olduğu ortaya konulmuştur (98). Kunduracılar'ın 2019 yılında yaptığı çalışmada PCR-RFLP ile tür tayini yaptığı TDM'ler arasında *M. intracellulare* ve *M. kansasii* türleri en yüksek oranda görülmüştür (99). Sardinas-Aragon ve arkadaşlarının 2019 yılında Küba'da akciğer örneklerinden 73 tüberküloz olmayan mikobakteri izolatu kullanarak çeşitli konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle yaptıkları çalışmada tespit edilen en baskın türlerin *Mycobacterium avium-intracellulare complex* ve *Mycobacterium fortuitum* olduğu görülmüştür (100).

Bu çalışmalardaki veriler ile karşılaştırıldığında çalışmamızda balgam örneklerinde yoğun saptanan *M. intracellulare*, *M. abscessus* ve *M. simiae* türlerinin çeşitli çalışmalarla uyumlu olduğu ancak karşılaşılan türlerin coğrafi bölgelere ve çevresel koşullara göre farklılık gösterebileceği görülmektedir.

Hoefsloot ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı; 6 kıta 30 ülke 62 laboratuvarı kapsayan, içinde Türkiye'den verilerin de bulunduğu (H. Şimşek: Refik Saydam Ulusal Halk Sağlığı Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara, Türkiye) geniş kapsamlı çalışmada elde edilen verilerde 91 TDM türü izole edilmiştir. Bu türler arasında çoğu ülkede baskın tür olarak *Mycobacterium avium* kompleksi (MAC) görülmüştür. Bu bakterileri *M. gordonae* ve *M. xenopi* takip etmiştir. Bizim çalışmamızda da en yüksek görülen tür *M. intracellulare* olmuş, bunu *M. abscessus*, *M. gordonae*, *M. simiae* takip etmiştir. Bu çalışmada en yüksek miktarda görülen ilk 6 türün arasında bizim çalışmamızla uyumlu olarak *M. abscessus* da bulunmaktadır. Çalışmamızda farklı olarak *M. simiae* oranı yüksek çıkmış olup, bu farkın *M. simiae*'nin su ve toprak gibi çevresel faktörlerden kaynaklanmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür (101).

Devallois ve arkadaşları 34 mikobakteri izolatu ile yaptıkları çalışmada PCR-RFLP yöntemini geliştirilerek rutinde kullanıma uygun bir yöntem olarak önermişlerdir (102). Cheunoy ve arkadaşları biyokimyasal testlerle PCR-RFLP yöntemini

karşılaştırmalı olarak uyguladıkları çalışmada PCR-RFLP yöntemini güvenilir, basit ve hızlı bir yöntem olarak tanımlamışlardır (103). Chimara ve arkadaşları; 2008 yılında yaptıkları çalışmada klinik örneklerden izole edilen 434 TDM izolatu geleneksel fenotipik yöntemler ve hsp65 PRA yöntemiyle değerlendirmişler ve iki yöntemin sonuçlarını hsp65 nükleotid sekans analizi ile karşılaştırmışlardır (87). PRA yöntemiyle sonuçları yüksek oranda doğru bulmuşlardır. Praveen ve arkadaşları 2018 yılında Hindistan’da yaptıkları çalışmada PCR-RFLP yönteminin mikobakterileri tür düzeyinde tayin etmekte geleneksel yöntemlere göre etkili bir yöntem olduğu sonucuna ulaşmışlardır (104). Barış ve Bayraktar 2020 yılında 141 mikobakteri izolatu ile yaptıkları çalışmada PNB testi ile MTBC olarak değerlendirilen bir izolatu, PCR-RFLP yöntemi ile TDM olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda PCR-RFLP yöntemini hızlı ve doğru tanı için diğer yöntemlerle kıyaslandığında uygun maliyetli ve kolay uygulanabilir bir yöntem olarak önermişlerdir (105).

Mikobakterilerin tür düzeyinde sadece fenotipik testlerle tanımlanması zordur. Geleneksel biyokimyasal testlerle başlangıçta *M. abscessus* olarak tanımlanan ve daha sonra genotipik yöntemlerle *M. fortuitum* olduğu ve biyokimyasal test sonuçlarının yeniden değerlendirildiği suşların raporları vardır (106). PCR-RFLP yönteminin en önemli dezavantajı ise benzer boyutlardaki fragmanların her zaman iyi bir şekilde ayırt edilmemeleri ve küçük fragmanların tanımlanmasının zor olabilmesidir (107).

Bu çalışmayla PCR-RFLP yönteminin mikobakterilerin tür düzeyinde değerlendirmelerinde faydalı bir yöntem olduğu, ancak özellikle görüntüleme işlemlerindeki standardizasyonun doğru türü belirlemede oldukça önemli olduğu saptanmıştır. Benzer büyüklükte DNA fragmanlarına sahip mikobakterilerin ayırt edilememesi ve kesim sonucu oluşan küçük bant paternlerinin değerlendirilmesinin zor olması bu çalışmada da karşılaştığımız zorluklardandır.

Testin uygulanmasında kritik önem taşıyan noktalar enzim kesim sonrası görüntüleme, uygun belirteç ve algoritmayla değerlendirilmesidir.

KAYNAKLAR

1. Murray PR. Tıbbi Mikrobiyoloji. 2010. 421–426 p.
2. WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. 2019.
3. Forbes, B.A Hall, G.S. Miller MB at al. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2018;31(2).
4. Gagneux S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. Nat Rev Microbiol. 2018;16(4):202–13.
5. Cafri, U. Aslan, G. Direkel, Ş. Tarhan, G. Ceyhan,İ. Emekdaş G. Çevre Örneklerinden Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin İzolasyonu Ve Tanımlanması. Mikrobiyal Bült. 2010;44:395–403.
6. Unubol N., Kızılkaya İ.T. Okullu S.O, Köksalan K. KT. Simple Identification of Mycobacterial Species by Sequence-Specific Multiple Polymerase Chain Reactions. Curr Microbiol. 2019; 76,791-798.
7. Alparslan A. Non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonlarında laboratuvar tanı ve duyarlılık testleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. 2003;389–96.
8. Sürücüoğlu S. Tüberküloz Basilinin İdentifikasyonu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. 2003;300–10.
9. Griffith, DE Aksamit, T Brown-Bliott B. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. 2007;(175):367–416.
10. Seber E. Tüberkülozun Dünyası. ANKEM. 2010;(24):52–60.
11. Barış İ. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun.
12. Barış İ. Dünyada Tüberküloz'un Tarihi. Konuralp Tıp Derg. 2010;3(2):1–4.
13. Kocabaş A. Akciğer Tüberkülozu Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3rd ed. Topçu AW, Söyletir G DM, editor. Nobel Tıp Kitapevleri; 2008. 538–540 p.
14. Kıyan M. Mycobacteriaceae. In: Ustaçelebi Ş, editor. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999. p. 419–55.
15. Babacan F HUE, Topçu AW, Söyletir G DM. Mycobacterium Tuberculosis Complex. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2008. p. 2283–302.
16. Gustafson P, Gomes V RP. Tuberculosis İn Bissau: Incidence And Risk Factor İn An Urban Community İn Sub-Saharan Africa. Int J Epidemiol. 2004;33(1):163–72.
17. Megan E. Billinger, Kenneth N. Olivier, Cecile Viboud, Ruben Montes de Oca, Claudia Steiner, Steven M. Holland DRP. Nontuberculous Mycobacteria–associated Lung Disease in Hospitalized Persons, United States, 1998–2005. Emerg Infect Dis. 2009;15(10):1562–1569.
18. Currie CS, Williams BG, Cheng RC DC. Tuberculosis epidemics driven by HIV:

- is prevention better than cure? AIDS. 2003;21(17).
19. Tüberküloz tanı ve tedavi rehberi. 1129, Ankara, Mayıs 2019
 20. van Ingen J, Boeree MJ, Dekhuijzen PN van SD. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. Clin Microbiol Infect. 2009;15(10):888–93.
 21. Uzun M. Non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonlarının epidemiyolojisi. 15 Türk Klin Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyon Hast Kongresi Kitabı. 2011;
 22. JO. F. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. JAppl Microbiol. 2009;107:356–67.
 23. Köksal F YA. Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı. 21Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. 2003;
 24. Holland S. Nontuberculous mycobacteria. Am J Med Sci. 2001;321(1).
 25. Kocabaş A. Akciğer Tüberkülozu. İlicin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın S, editor. Temel İç Hastalıkları. 1996. p. 456–76.
 26. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Bornova,İzmir; 2009.
 27. Coville, PS. Witebsky F. Nocardia and other aerobic actinomycetes. In: Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 2005. p. 1137–80.
 28. Otlı B. Mikobakterilerde laboratuvar. In: Altındış M, editor. Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvar kitabı. Nobel Tıp. 2013.
 29. Pfyffer GE, Brown BA, Swenson JM WRJ. Mycobacterium: General Characteristics, Isolation and Staining Procedures. 2903;
 30. Vernon A. Treatment of latent tuberculosis infection. Semin Respir Crit Care Med. 2013;34:67–86.
 31. Lawn SD ZA. Tuberculosis. Lancet. 2011;378(9785):57-72.
 32. (CDC). C for DC and P. Human tuberculosis caused by Mycobacterium bovis-- New York City, 2001-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2005;54(24):605–8.
 33. Albay A. Mycobacterium: Genel Özellikleri, Laboratuvar Tanısı ve Boyama İşlemleri. In: Klinik Mikrobiyoloji.
 34. Prevention. C for DC and. Mycobacterium bovis (bovine tuberculosis) in humans, fact sheet. Atlanta; 2012.
 35. de Jong BC, Antonio M GS. Mycobacterium africanum--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(9).
 36. Wood R. Clinical Features and Management of HIV/AIDS. In: Manson's Tropical Infectious Diseases. 2014.
 37. González-Pérez, M., Mariño-Ramírez, L., Parra-López, C. A., Murcia, M. I., Marquina, B., Mata-Espinoza, D., Hernandez-Pando R. Virulence and Immune Response Induced by Mycobacterium avium Complex Strains in a Model of

- Progressive Pulmonary Tuberculosis and Subcutaneous Infection in BALB/c Mice. *Infection and Immunity*. 2013;81(11):4001–12.
38. Turenne CY, Wallace R Jr BM. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:205–29.
 39. N. Bruffaerts A, C. Vluggen, L. Duytschaever, V. Mathys, C. Saegerman, O. Chapeira KH. Genome Sequences of Four Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, Isolated from Swine and Humans, Differing in Virulence in a Murine Intranasal Infection Model. *Genome Announc*. 2016;4(3).
 40. Koneman, EW Allen S. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2006. 1064–1124 p.
 41. Cassidy PM, Hedberg K, Saulson A, McNelly E WK. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis*. 2009;49.
 42. Coolen-Allou, N., Touron, T., Belmonte, O., Gazaille, V., Andre, M., Allyn, J., ... Veziris N. Clinical, Radiological, and Microbiological Characteristics of *Mycobacterium simiae* Infection in 97 Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(7).
 43. Mansfield, Keith G. Fox JG. The Common Marmoset in Captivity and Biomedical Research. In: *Bacterial Diseases*. 2019. p. 265–87.
 44. Hofbauer G, Burg G NF. Sporotrichoid infection with *Mycobacterium marinum*: successful therapy with oral tetracycline administration. *Hautarzt*. 2000;51(5):349–52.
 45. Cook J. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *Br Med Bull*. 2010;96(45):59.
 46. Okano Y, Shinohara T, Imanishi S, Takahashi N, Naito N, Taoka T, Kadota N OF. Miliary pulmonary nodules due to *Mycobacterium xenopi* in a steroid-induced immunocompromised patient successfully treated with chemotherapy: a case report. *BMC Pulm Med*. 2016;16(9).
 47. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC WG. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. In: Lippincott.
 48. Kent, PT Kubica G. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. US Dep Heal Hum Serv Centers Dis Control. 1985;
 49. Hoop RK, Bottger EC, Ossent P SM. Mycobacteriosis due to *Mycobacterium genavense* in six pet birds. *J Clin Microbiol*. 1993;31:990–3.
 50. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML PM. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Klinik Mikrobioloji BA, editor. 2009. 543 p.
 51. Wolinsky E. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. *Clin Infect Dis*. 1995;20:954–63.
 52. Esteban , J García-Pedrazuela , M Muñoz-Egea, MC Alcaide F. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;13(7):967–86.

53. Saad, J., Levasseur, A., Drancourt M. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium shimoidei* Strain P7336. *Microbiol Resour Announc.* 2018;7(13).
54. Tortoli, E Kohl, TA Brown-Elliott, B Trovato, A Leao, SC Garcia, MC Vasireddy, S Turenne, CY Griffith, DE Philley, CV Baldan, R Campana, S Cariani, L Colombo, C Taccetti, G Teri, A Niemann, S Wallace Jr, RJ Cirillo D. Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66.
55. Baron EJ FS. *Mycobacteria*. In George O, Berlin W. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. St.Louis: The CV Mosby Company,. 1990;
56. Brown-Elliott , BA Philley J. Rapidly growing mycobacteria. *Microbiol Spectr.* 2017;
57. Shinnick, TM . Good R. *Mycobacterial taxonomy*. *Microbiol Infect Dis.* 1994;(13):884–901.
58. Kocagöz T. *Mycobacterium Türlerinin Genel Özellikleri*. In: AW T, Söyletir G D, editors. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 2008. p. 2277–83.
59. Durupınar B. Mikobakteriler ve çevre koşullarına dayanıklılıkları. *OMÜ Tıp Derg.* 1996;
60. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH LM. *Manual of Clinical Microbiology*. Başustaoglu, editor. 2009.
61. Metchock , BG. Nolte , FS. Wallace R. *Mycobacterium*. In: Murray, PR Baron , EJ Pfaller, MA Tenover F, Jorgensen J, editors. *Manuel of Clinical Microbiology*. 2003.
62. Isenberg D. Homogenization-decontamination Procedures. In: *Essentials procedures for clinical microbiology*. 2000. p. 182–4.
63. Forbes , B Sham, D Weissfeld A. *Bailey Scott's Diagnostic Microbiolog.* 2002. 538–571 p.
64. Ulukanlıgil , M Aslan , G Taşcı SA. Comparative Study on the Different Staining Methods and Number of Specimens for the Detection of Acid Fast Bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(6):855–8.
65. Arıca, GS Arıca, V Özer C. Çocuklarda tüberküloz tanı yöntemleri. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü Derg.* 2011;1(3):38–44.
66. Control. EC for DP and. *Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union*. 2018.
67. Clinical and Laboratory Standarts Institute C. *Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Proposed Guideline*. 2018.
68. Köksalan, OK Aydın, MD Eraslan, S Bekiroglu N. 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(4):314–7.

69. Ersöz, G Arslan G. Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri. In: Grubu TKDTÇ, editor. 21 YY'da Tüberküloz Sempozyumu Tüberküloz Lab Tanı ve Yönt Uygulamalı Kursu Kitabı. 2003.
70. Sürücüoğlu S. Tüberküloz Basilinin Klasik Yöntemlerle İdentifikasyonu. In: VIII Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı Erzurum. 2009. p. 36–48.
71. Kısa Ö. Mycobacterium: Yavaş Üreyen Mikobakterilerin Laboratuvar Özellikleri. In: Başustaoğlu, A Kubar, A Yıldırım, ŞT Tanyüksel M eds. ., editor. Klinik Mikrobiyoloji. 2009.
72. Sandgren, A Strong, M Muthukrishnan, P Weiner, BK Church, GM Murray M. Tuberculosis drug resistance mutation database. PLoS Med. 2009;6(2).
73. Saniç A. Tüberküloz Tanısında Moleküler Yöntemlerin Yeri. ANKEM Derg. 2007;21(Ek2):81–5.
74. Akyar I. Kütle Spektrometrisinin Mikrobiyolojide Kullanımı. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilim Derg. 2011;
75. Tarhan G. Enfeksiyon Hastalıklarının Tanısında Kullanılan Nükleik asit Amplifikasyon Yöntemleri. Güncel Gastroenteroloji. 2002;6/3:177–83.
76. Appak Ö. Tüberküloz Dışı Mikobakteri Etkenlerinin Tür Düzeyinde Tanımlanması. Dokuz Eylül Üniversitesi; 2011.
77. Esen N. Mikobakterilerin Tanısında, Tanımlanmasında Ve İlaç Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. İnfeksiyon Derg (Turkish J Infect. 2003;17(4):507–11.
78. Patel J et al. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. J Clin Microbiol. 2000;38:246–51.
79. Parsons, LM Somosko'vi, A Gutierrez, C Lee, E Paramasivan, CN Abimiku, A Spector, S Roscigno, G Nkengasong J. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. Clinical Microbiology Reviews. 2011;24(2):314–50.
80. Alp A. Non-Tüberküloz Mikobakteri İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı Ve Duyarlılık Testleri. In: 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu [Internet]. [cited 2018 Jul 21]. Available from: http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/982011131059-Alpaslan_Alp.pdf
81. Özyurt M. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısında Kullanılan Moleküler Ticari Tanı Sistemleri. In: 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu.
82. Sürücüoğlu S. Tüberküloz dışı mikobakteri infeksiyonları: Neredeyiz? Yeni tanı yöntemleri ve sorunları. In: 15 Türk Klinik Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı. 2011. p. 166–71.
83. Cheunoy, W Prammananan, T Chairasert , A Foongladda S. Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: two

- amplified targets, hsp65 and rpoB, for identification of cultured mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;51(3):165–71.
84. 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(2):175–8.
 85. Brown T. Gen Klonlama ve DNA Analizi. 2013. 62–65 p.
 86. Ergin, A Kocagöz, T Us D. Evaluation of 120 Mycobacterial Strains Isolated from Clinical Specimens to the Species Level by Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis. *Scand J Infect Dis*. 2000;32(6):657–62.
 87. Chimara , E Ferrazoli , L Yoko S at al. PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol*. 2008;8(48).
 88. Ergin , M.A Kocagöz, T. Us, D. Günalp A. PCR-RFLP ile Mikobakterilerin Tür Düzeyinde Tanımlanması. *Mikrobiyol Bült*. 1999;(33):251–61.
 89. Joao, I Cristovao, P Antunes, L Nunes , B Jordao L. Identification of nontuberculous mycobacteria by partial gene sequencing and public databases. *Int J Mycobacteriology*. 2014;3(2):144–51.
 90. Taylor, T.B. Patterson, C. Hale, Y. Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol*. 1997;35(1):79–85.
 91. Tarhan, G. Kocagöz, T. Cesur, S. Ceyhan I. The Place and Importance of Pcr-Rflp Method In Determination of Mycobacteria Species In Routine Laboratory Practice. *Adv Biotech Micro*. 2017;3(3).
 92. Tortoli E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:906–10.
 93. Leber, A Marras T. The cost of medical management of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in Ontario, Canada. *Eur Respir J*. 2011;37(5):1158–65.
 94. Kim, K.J.K, Rheem I. Identification and Distribution of Nontuberculous Mycobacteria from 2005 to 2011 in Cheonan. *Tuberc Respir Dis*. 2013;74:215–21.
 95. Nour-Neamatollahie, A Ebrahimzadeh, N Siadat , SD Vaziri , F Eslami , M Akhavan, SA Fateh A. Distribution of non-tuberculosis mycobacteria strains from suspected tuberculosis patients by heat shock protein 65 PCR–RFLP. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24(6):1380–6.
 96. Appak, Ö Türkel, S Esen, N Özkütük A. Comparison of polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis method and DNA sequence analysis results in the identification of non-tuberculous mycobacteria. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2018;113.
 97. Nasiri, MJ Dabiri, H Fooladi, A. A. I Amini, S Hamzehloo, G Feizabadi M. High rates of nontuberculous mycobacteria isolation from patients with presumptive tuberculosis in Iran. *New Microbes New Infect*. 2018;21:12–7.
 98. Mortazavi, Z Bahrmand, A Sakhaee, F Hosseini Doust, R Vaziri, F Siadat, S.D

- Fateh A. Evaluating the clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory samples in Iran: an often overlooked disease. *Infect Drug Resist.* 2019;12:1912–7.
99. Kunduracılar H. Identification of mycobacteria species by molecular methods. *Int Wound Journal.* 2019;
 100. Sardiñas-Aragón, Misleidis Mederos, Lilian Leon, Grechen Caridad Rosarys-Martínez, María Lemus, Dihadenys Díaz-Rodríguez R. Identificación rápida de micobacterias no tuberculosas en Cuba por las técnicas «GenoType Mycobacterium CM/AS». *NCT Neumol y Cirugía Tórax.* 2019;78:290–5.
 101. Hoefsloot, W., van Ingen, J., Andrejak, C., Ängeby, K., Bauriaud, R., Bemer, P., Chihota V. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J.* 2013;42(6):1604–13.
 102. 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(11):2969–7.
 103. Cheunoy, W., Prammananan, T., Chaiprasert, A., & Foongladda, S. (2005). Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: Two amplified targets, hsp65 and rpoB, for identification of cultured mycobacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 51(3), 165–171.
 104. Praveen, Kumar V Sreenivasulu, Reddy V Muni, Krishna P Vamsi P S. Molecular Identification of Rapidly Growing Mycobacteria Isolated from Pulmonary Specimens at a Tertiary Care Hospital in Pondicherry. *Indian J Public Heal Res Dev.* 2018;9(7):260–4.
 105. Barış A, Bayraktar B. Identification of the Mycobacterial Strains Isolated From Clinical Specimens Using hsp65 PCR-RFLP Method. *Med Bull Sisli Etfal Hosp* 2020;54(3):364–370
 106. Pai , S Esen, N Pan, X Musser JM. Routine rapid Mycobacterium species assignment based on species-specific allelic variation in the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65). *Arch Pathol Lab Med.* 1997;121(8):859–64.
 107. Ringuet, H Akoua-Koffi , C Honore, S Varnerot , A Vincent , V Berche, P Gaillard J, CPierre-Audiger. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):857–2.