

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**MATRİKS DESTEKLİ LAZER
DEZORPSİYON/İYONİZASYON-UÇUŞ ZAMANI
KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE TÜBERKÜLOZ
DIŞI MİKROBAKTERİLERİN TÜR DÜZEYİNDE
TANIMLANMASI**

DR. MERT MANYASLI

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2021

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**MATRİKS DESTEKLİ LAZER
DEZORPSİYON/İYONİZASYON-UÇUŞ ZAMANI
KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE TÜBERKÜLOZ
DIŞI MİKROBAKTERİLERİN TÜR DÜZEYİNDE
TANIMLANMASI**

UZMANLIK TEZİ
DR. MERT MANYASLI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NURAN ESEN

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim süresince iyi bir yol gösterici olan, bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan, tüm sorunlarımda bana yardımcı olan tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nuran ESEN'e, uzmanlık eğitimime olan katkılarından dolayı başta değerli eğitim danışmanım Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER ve değerli hocamız Prof. Dr. Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK olmak üzere birlikte çalıştığım tüm hocalarıma çok teşekkür ederim. Tez çalışmamda ve asistanlığım boyunca benden yardımlarını, bilgilerini, dostluklarını esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım Araş. Gör. Nazlı ARSLAN, Biyolog Feryal UYSAL ve Macide OYLUM'a teşekkür ederim. Asistanlığım boyunca aynı ortamı paylaştığım ve birlikte çalıştığım tüm uzman, asistan ve teknisyen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, her anımda bana destek olan ve üzerimde büyük emekleri olan aileme, zorlu tez sürecinde bana olan desteği, ilgi ve anlayışı için değerli yol arkadaşım ve sevgili eşim Gülden'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	I
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
TABLO LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Tarihçesi.....	5
2.2. Mikobakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	6
2.2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri.....	6
2.2.2. Mikobakterilerin Hücre Duvar Yapısı.....	6
2.2.3. Mikobakterilerin Üreme Özellikleri.....	8
2.3. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Sınıflandırılması.....	8
2.4. TDM'lerin Epidemiyolojisi.....	11
2.4.1. Dünyada TDM Epidemiyolojisi.....	11
2.4.2. Türkiye'de TDM Epidemiyolojisi.....	12
2.5. TDM'lerin Çevreyle İlişkisi ve Bulaş Yolları.....	14
2.6. TDM'lerin Tanısı.....	15
2.6.1. TDM'lerin Klinik Tanısı.....	15
2.6.2. TDM'lerin Mikrobiyolojik Tanısı.....	17
2.6.2.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi.....	17
2.6.2.2. Mikroskopik İnceleme.....	19

2.6.2.3. Kültür Yöntemleri.....	21
2.6.2.3.1. Yumurta Bazlı Besiyerleri.....	21
2.6.2.3.2. Agar Bazlı Besiyerleri.....	21
2.6.2.3.3. Seçici Besiyerleri.....	22
2.6.2.3.4. Otomatize ve Yarı Otomatize Sistemler.....	23
2.7. TDM'lerin Tür Düzeyinde Tanımlanması.....	24
2.7.1. Fenotipik Testler.....	25
2.7.2. Moleküler Testler.....	30
2.7.2.1. DNA Dizi Analizi.....	30
2.7.2.2. PRA.....	32
2.7.2.3. Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri.....	32
2.7.2.4. DNA Microarray.....	34
2.7.3. HPLC.....	34
2.7.4. MALDI-TOF MS.....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. Çalışma Grubu.....	38
3.2. TDM'lerin Hibridizasyon Testi ile Tanımlanması.....	39
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	39
3.2.2. PZT ile Amplifikasyon.....	40
3.2.3. Hibridizasyon İçin Ön Hazırlık.....	41
3.2.4. Hibridizasyon Reaksiyonu.....	41
3.3.MALDI-TOF MS Yöntemi ile TDM'lerin Tanımlanması	43
3.3.1. TDM'lerin Üretilmesi.....	43

3.3.2. MALDI-TOF MS Yöntemi için TDM'lerin İşlemlenmesi.....	44
3.3.2.1. Organik Çözücünün Hazırlanması.....	44
3.3.2.2. Matriks Solüsyonunun Hazırlanması.....	44
3.3.2.3. TDM'lerin Protein Ekstraksiyon İşleminin Yapılması.....	44
3.3.2.4. MALDI-TOF MS Cihazı ile Tanımlama İşlemi.....	46
4. BULGULAR.....	47
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
7. KAYNAKLAR.....	63
8. EKLER.....	78
Ek 1. Etik Kurul Onayı.....	78
Ek 2. Filtresiz Tez İntihal Raporu.....	79
Ek 3. Filtreli Tez İntihal Raporu.....	81

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Mikobakteri hücre duvarı.....	7
Şekil 2: Mikobakterilerin EZN boyanma görüntüsü.....	19
Şekil 3: MALDI-TOF MS çalışma prensibi.....	37
Şekil 4: GenoType Mycobacterium CM tanımlama kartı.....	42
Şekil 5: GenoType Mycobacterium AS tanımlama kartı.....	43
Şekil 6: LJ besiyerinde üreyen TDM kolonileri.....	43
Şekil 7: Matriksi kuruyan MALDI hedef plakanın görüntüsü.....	46
Şekil 8: MALDI-TOF MS ile <i>Mycobacterium chimaera-intracellulare</i> group olarak tanımlanan bir izolata ait kütle spektrum grafiği.....	47
Şekil 9: MALDI-TOF MS ile <i>M. kansasii</i> olarak tanımlanan bir izolata ait kütle spektrum grafiği.....	48
Şekil 10: MALDI-TOF MS ile <i>M. lentiflavum</i> olarak tanımlanan bir izolata ait kütle spektrum grafiği.....	48
Şekil 11: MALDI-TOF MS ile tanımlanan izolatlar için skor dağılımı.....	52

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Runyon'un mikobakteri sınıflaması.....	9
Tablo 2: Woods ve Washington'un mikobakteri sınıflaması.....	10
Tablo 3: TDM Akciğer enfeksiyonu tanısında kullanılan klinik ve mikrobiyolojik kriterler..	16
Tablo 4: Preparat değerlendirme kriterleri.....	20
Tablo 5: Mikobakterilerin tanısında kullanılan fenotipik özellikler.....	29
Tablo 6: Çalışmadaki TDM türlerinin yıllara ve örneklere göre dağılımı.....	38
Tablo 7: GenoType Mycobacterium CM/AS ve MALDI-TOF MS sonuçları.....	49
Tablo 8: GenoType Mycobacterium CM/AS ve Bruker MALDI-TOF MS testleri için birim maliyet değerleri ve test süreleri.....	53

KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ACN: Asetonitril

AG: Arabinogalaktan

AIDS: Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu – ‘*Acquired Immune Deficiency Syndrome*’

ARB: Aside dirençli bakteri

AS: Ek türler – ‘*Additional species*’

ATS: Amerikan Toraks Derneği – ‘*American Thoracic Society*’

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CM: Sık görülen mikobakteriler – ‘*Common mycobacteria*’

CON: Konjugat

DEN: Denatürasyon solüsyonu – ‘*Denaturation solution*’

DHB: Dihidroksibenzoik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

EZN: Ehrlich-Ziehl-Neelsen

HCCA: Hidroksisinnamik asit

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü – ‘*Human Immunodeficiency Virus*’

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- ‘*High Performance Liquid Chromatography*’

HRCT: Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi- ‘*High Resolution Computed Tomography*’

HYB: Hibridizasyon tamponu – ‘*Hybridization buffer*’

IDSA: Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği – ‘*Infectious Diseases Society of*

America'

ITS: '*Internal transcribed spacer*'

LAM: Lipoarabinomannan

LJ: Löwenstein-Jensen

LOS: Lipooligosakkarit

LYS: Lizis tamponu – '*Lysis buffer*'

MAK: *Mycobacterium avium* kompleks

MALDI-TOF MS: Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon/ İyonizasyon- Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi – '*Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*

MGIT: '*Mycobacteria growth indicator tube*'

MTK: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

NaCl: Sodyum klorür

NALC: N-Asetil-L-Sistein

NaOH: Sodyum hidroksit

NB: Nötralizasyon tamponu – '*Neutralization buffer*'

NTM: *Nontuberculous mycobacteria*

OADC: Oleik asit- dekstroz- katalaz

PANTA: Polimiksin B- amfoterisin B- nalidiksik asit- trimetoprim- azlosilin

PG: Peptidoglikan

PNM: '*Primer/nucleotide mix*'

PPD: '*Purified protein derivative*'

PRA: Restriksiyon enzim analizi

PZA: Pirazinamid

PZT: Polimeraz zincir tepkimesi

RFLP: Restriksiyon fragman uzatma polimorfizmi

RGM: '*Rapidly growing mycobacteria*'

RIN: Rinse solüsyonu

RNA: Ribonükleik asit

STR: Yıkama solüsyonu

SUB: Substrat

TBE: Tris – Borat – Etilen diamin tetraasetik asit

TDM: Tüberküloz dışı mikobakteri

TFA: Trifloroasetik asit

TNF: Tümör nekrozis faktör

T2H: Tiofen-2 karboksilik asit hidrazid

ÖZET

Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon/İyonizasyon-Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi ile Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Tür Düzeyinde Tanımlanması

Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM), genelde çevresel kaynaklarla bulaşan, kronik enfeksiyonlara yol açan mikroorganizmalardır. Günümüzde 190'dan fazla mikobakteri türü tanımlanmıştır. Bunların çoğunluğu henüz enfeksiyon etkeni olarak gösterilmemiştir. TDM'lerin tedavisi türe göre değişkenlik göstermektedir. Tür düzeyinde tanımlama yapmak için uygulaması kolay, ucuz ve hızlı bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Son yıllarda kullanılan matriks destekli lazer dezorpsiyon/iyonizasyon-uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) bu özelliklere sahiptir.

Bu amaçla, çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na 2013-2019 yılları arasında gönderilen hasta örneklerinden yapılan kültürlerde üremiş ve nükleik asit hibridizasyon yöntemiyle tür düzeyinde tanımlanmış olan 22 *Mycobacterium abscessus*, 4 *Mycobacterium chelonae*, 37 *Mycobacterium fortuitum*, 5 *Mycobacterium gordonae*, 9 *Mycobacterium intracellulare*, 4 *Mycobacterium kansasii*, 1 *Mycobacterium lentiflavum*, 3 *Mycobacterium szulgai* izolatı MALDI-TOF MS yöntemi ile çalışıldı. 83/85 (%97.6) izolat MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde tanımlandı. 81/85 (%95.2) izolat için iki testin sonuçları uyumlu kabul edildi.

Gerek doğru epidemiyolojik veri elde etmek, gerekse uygun antimikrobiyal yönetimi sağlamak için TDM'lerin tür düzeyinde tanımlaması büyük önem taşımaktadır. MALDI-TOF MS, TDM tür tayini için kullanılması uygun bir yöntem olarak görünmektedir. Çalışmamızda moleküler bir yöntemle yüksek uyum gösterdiği saptanmıştır. Uygulaması kolay, maliyet etkin ve yaklaşık 90 dakikada sonuç veren bir yöntemdir. Bununla beraber kütüphanesinde bazı iyileştirmelerin yapılmasıyla daha iyi sonuçlar alınacağı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Tüberküloz dışı mikobakteri, tür düzeyinde tanımlama, kütle spektrometresi, MALDI-TOF MS

SUMMARY

Identification of Nontuberculous Mycobacteria at Species Level by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are the microorganisms that is transmitted from environmental sources and leads to chronic infections. Nowadays more than 190 mycobacteria species are identified. Most of them have not been shown as an agent of infection yet. Treatment protocols of NTM show difference according to species. It is needed that an easy to perform, cheap and fast method for identification at species level. Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) used in recent years have this features.

With this aim, 22 *Mycobacterium abscessus*, 4 *Mycobacterium chelonae*, 37 *Mycobacterium fortuitum*, 5 *Mycobacterium gordonae*, 9 *Mycobacterium intracellulare*, 4 *Mycobacterium kansasii*, 1 *Mycobacterium lentiflavum*, 3 *Mycobacterium szulgai* isolates that are grown by cultures of patient samples sent to Dokuz Eylül University Central Laboratory between 2013-2019 and identified at species level by nucleic acid hybridization method are studied with MALDI-TOF MS in the study. 83/85 (%97.6) isolates are identified at species level by MALDI-TOF MS. The results of two tests are accepted as concordant for 81/85 (%95.2) isolates.

Identification of NTM carries great importance for both acquiring true epidemiologic data and provide suitable antimicrobial management. MALDI-TOF MS appears as a suitable method for species identification of NTM. It is detected that it has high concordance with a molecular method in our study. It is a method that is easy to use, cost effective and gives result about 90 minutes. All of that, it is considered that better results will be taken by doing some improvements in its library.

Key words: Nontuberculous mycobacteria, identification at species level, mass spectrometry, MALDI-TOF MS

1.GİRİŞ VE AMAC

Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir (1). 1990'lı yıllardan itibaren dünya genelinde TDM'lere bağlı pulmoner enfeksiyon insidansının arttığı gösterilmiştir (2). Gerek immün sistemi baskılanmış bireylerde, gerekse immün sistemi sağlam kişilerde enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (AIDS) hastaları, organ nakli geçiren ve diğer nedenlerle bağışıklığı baskılanmış kişiler risk altındadır. Pulmoner enfeksiyon, lenfadenit, yumuşak doku, kemik ve eklemlerde enfeksiyon, iyatrojenik enfeksiyon oluşturmaktadır (3). TDM'ler toprakta ve su kaynaklarında yaygın olarak bulunmaktadır (4). En sık aerosoller şeklinde solunum yoluyla, bunun dışında sindirim yoluyla ve deriden temas yoluyla bulaşmaktadır (5,6).

Günümüzde tür düzeyinde 190'ın üzerinde TDM tanımlanmıştır. Bunlardan yaklaşık 40 tür patojen olarak değerlendirilmektedir (7). TDM türlerinin dünya genelindeki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir (8). Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması gerçek patojen ve çevresel kontaminant ayırımında önem taşımaktadır. Amerikan Toraks Derneği (ATS) ve Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA), tüberküloz dışı mikobakterilerin tanısında tür düzeyinde tanımlama önermektedir (9). Tanımlamanın doğru yapılması etkin tedavinin erken başlanması ve ilaç direnci gelişiminin önlenmesi açısından önemlidir.

Mikobakteriler geçmişte biyokimyasal yöntemler, koloni morfolojisi ve diğer fenotipik yöntemlerle tanımlanmıştır (10). Ancak bu yöntemler zaman alıcı, tecrübe gerektiren ve yanlış tanıya neden olabilen yöntemlerdir (11,12). Hibridizasyon temelli testler ve genetik sekanslama gibi moleküler yöntemler mikobakterilerin tanımlanmasında altın standart yöntemler haline gelmiştir (12). Ancak bu yöntemler pahalı ve teknik olarak uzmanlık gerektiren testlerdir (12,13). Mikobakterilerin rutin laboratuvar tanısında kullanılabilecek güvenilir, hızlı, kolay çalışılabilen ve maliyeti uygun bir teste ihtiyaç duyulmaktadır. MALDI-TOF MS yöntemi mikobakterilerin rutin tanısında henüz yaygınlaşmamıştır. Veritabanında yapılacak kütüphane güncellemeleriyle yöntemin optimize edilmesi gerekmektedir. Ancak hızlı, uygun maliyetli ve doğru tanımlama yapabilen bir yöntem olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (11,12,14). Çalışmamızda bu verilere dayanarak MALDI-TOF MS yöntemi ve

hibridizasyon testi karşılaştırılmış, avantaj ve dezavantajları belirlenmiş, MALDI-TOF MS yönteminin rutin tanıda kullanıma uygunluğu değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Tarihçesi

1882 yılında Alman hekim Robert Koch tarafından tüberküloz basili keşfedilmiştir. 19. yüzyılın sonlarına doğru sığırlarda, kuşlarda, sürüngenlerde, balıklarda farklı mikobakteriler tanımlanmıştır. Bu mikobakteriler için paratüberküloz, psödotüberküloz, anonim, atipik, çevresel, fırsatçı ve tüberküloz dışı mikobakteriler gibi isimler kullanılmıştır. “Tüberküloz dışı mikobakteriler” (TDM), bu mikobakteriler için günümüzde kullanılan isimdir (15). *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) ve *Mycobacterium leprae* dışında kalan tüm mikobakterilere TDM adı verilmiştir. 1860’lı yıllarda tüberkülozun kuşlardaki formuna neden olan bir basil tanımlanmıştır. 1890 yılında bu basilin tüberküloz basilinden farklı bir basil olduğu saptanmıştır. Buna “avian” ya da “kuş” basili adı verilmiştir (15, 16). Daha sonra bu basil *Mycobacterium avium* ismini almıştır. 1885 yılında Alvarez ve Tavel, insana ait sekresyonlarda “smegma basili” olarak adlandırılan, daha sonra *Mycobacterium smegmatis* adını alan aside dirençli boyanan bir mikroorganizma tanımlamıştır (15).

20. yüzyılın erken döneminde klinik örneklerden izole edilen çeşitli tüberküloz dışı mikobakteriler bildirilmiştir. Ancak o yıllarda hekimler tüberküloz ile mücadele ettiği için *M. tuberculosis* ve *Mycobacterium bovis* dışındaki türlerin önemi anlayamamıştır. 1926’da Aronson, Philadelphia akvaryumundaki tuzlu su balıklarında hastalık oluşturan bir basil saptamış ve buna *Mycobacterium marinum* adını vermiştir. Bu etkenin kültürde üreyen kolonilerinin başlangıçta limon sarısı renginde olduğunu daha sonra koyu turuncu renkte gördüğünü gözlemlemiştir. 1938’de *Mycobacterium fortuitum* da Costa Cruz tarafından, 1952’de *Mycobacterium abscessus* Tarshis ve Frisch tarafından insanda hastalık oluşturan mikobakteriler olarak tanımlanmıştır. 1943’te *M. avium* ilk kez bir hastanın akciğerlerinden etken olarak izole edilmiştir. 1953 yılında Bühler ve Pollak, “sarı basil” hastalığı adını verdikleri iki olgudan bahsetmişlerdir, daha sonra bu olgulardaki etkene *Mycobacterium kansasii* adı verilmiştir (15).

1930’lu yıllarda Pinner, TDM’lerin sudan ve diğer çevresel kaynaklardan, aynı zamanda insanlardan alınan örneklerden kültür yoluyla üretilebileceğini ifade etmiştir. Bazı mikobakterilerin kromojenik özellikte olduğunu, bazılarının hızlı ürediğini fark etmiş, ancak mikobakterileri sınıflandırmaya yarayan bir sistem oluşturamamıştır. Bundan yaklaşık 20 yıl sonra Alice Timpe ve Ernest H. Runyon, Amerika Birleşik Devletleri’nin (ABD) farklı

bölgelerinden elde ettikleri TDM'leri incelemiş, koloni görünümleri ve üreme özelliklerini dikkate alarak TDM'leri 4 gruba ayırarak sınıflandırmışlardır (16).

Başta solunum yolu örnekleri olmak üzere klinik örneklerden izole edilen TDM'ler uzun süre kontaminant olarak değerlendirilmiş ve klinik açıdan önemsiz oldukları düşünülmüştür. Klasik antitüberküloz tedaviye yanıt vermemeleri, TDM tanı ve tedavisinde gelişmelere yol açmıştır. 1980'lerin ortalarından itibaren AIDS hastalarının artışıyla birlikte özellikle *M. avium* kompleks (MAK) ölümcül seyretmeye başlamıştır (17,18). Azitromisin ve klaritromisin gibi makrolidlerin de dahil olduğu çoklu antibiyotik kombinasyonları tedavi ve profilaksizde kullanılmıştır. Özellikle antiretroviral tedavideki başarılar sonucunda AIDS'e bağlı fırsatçı mikobakteri enfeksiyon sıklığında da azalma meydana gelmiştir (17).

2.2. Mikobakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri

2.2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

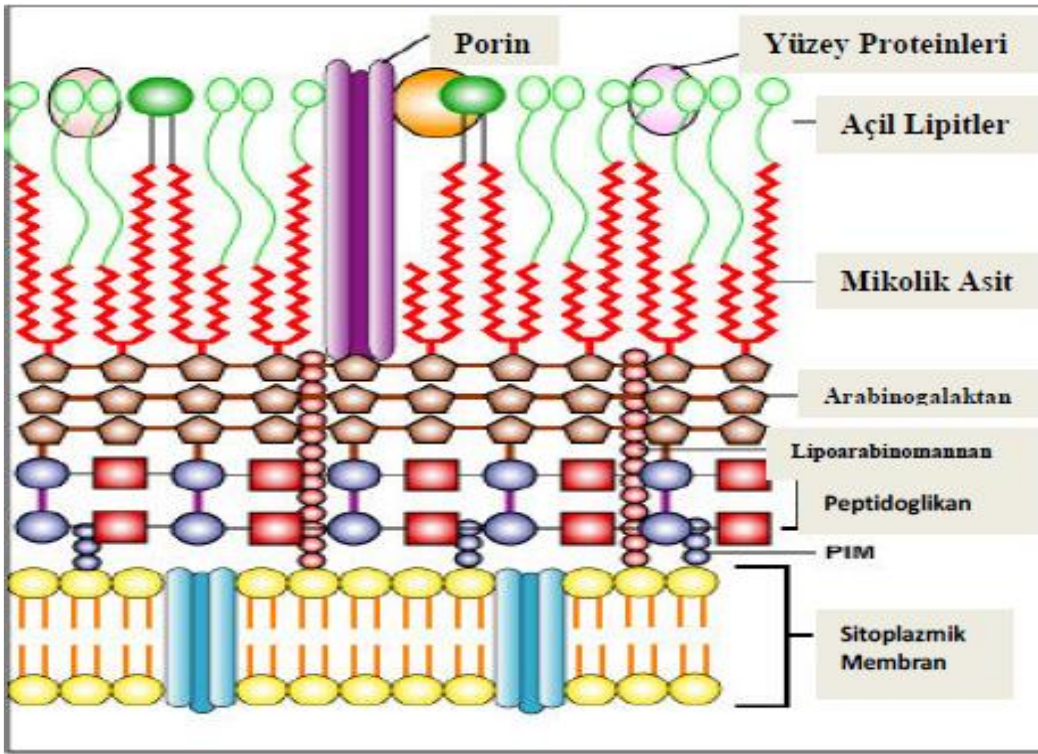
Actinomycetales takımında bulunan *Mycobacteriaceae* ailesindeki tek cins *Mycobacterium* cinsidir (15). *Mycobacterium* türlerinin deoksiribonikleotid (DNA) yapısında guanin ve sitozin baz çiftinin yüzdesi [*M.leprae* (%55) hariç 61-71 mol%] *Gordonia* (63-69 mol%), *Tsukamurella* (68-74 mol%), *Nocardia* (64-72 mol%), *Rhodococcus* (63-73 mol%), *Segniliparus* (68-72 mol%) gibi mikolik asit içeren diğer türlerle benzer düzeydedir (17).

Mikobakteriler aerob, sporsuz, hareketsiz, mikroskopik olarak hafif kıvrık ya da düzgün basiller şeklinde görünen, 0,2-0,6 µm eninde ve 1-10 µm boyunda olan, bazen dallanma özelliği gösteren mikroorganizmalardır. Kültürde düzgün veya düzensiz görünümlü koloniler oluşturmaktadırlar. Pigmentsiz ya da pigmentli koloniler oluşturan türleri vardır. Sarı, turuncu, nadiren pembe renkte koloniler oluşturabilirler. Renk oluşumu karotenoid pigmentler aracılığıyla olmaktadır (16). Karotenoid pigmentlerin oksidatif stresin mikobakteriyi korumada rol aldığı düşünülmektedir (18,19).

2.2.2. Mikobakterilerin Hücre Duvar Yapısı

Mikobakterilerin dış kısmında bir plazma membranı, bunun üzerinde de bir hücre duvarı bulunmaktadır. Hücre duvarı 3 tabakadan oluşur (Şekil 1). En içte plazma membranına komşu olan kısım elektron yoğun tabakadır. Bu tabaka temel olarak peptidoglikanlardan (PG) oluşur. Bu tabakadaki N-glikolilmuramik asit heteropolisakkarit arabinogalaktan tabakaya fosfodiester bağlarıyla bağlanır. Orta tabaka olan elektron transparan tabaka duvara

hidrofobik özellik kazandırır. Temel olarak arabinogalaktan (AG) ve bunlara kovalent bağlanan mikolik asitlerden meydana gelmiştir. En dışta elektron opak tabaka bulunur. Fibriler, granüler ya da homojen görünümde olabilir. Bu tabaka temel olarak mikolik asitlerden meydana gelir. Mikobakterilerde bulunan mikolik asitler 70-90 karbonlu, yüksek moleküler ağırlıklı yağ asitleridir. Mikolik asitler ya arabinogalaktana bağlı ester formunda ya da trehaloz gibi şekerlere bağlı olarak kord faktör (trehaloz 6-6' dimikolat) yapısında bulunurlar (20,21). Kord faktörün sitokin salınımı, granülom oluşumu, anjiyogenez ve antitümör aktivitede rolü bulunmaktadır (22-24).



Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı

Lipoarabinomannan (LAM) molekülleri plazma membranından başlayıp hücre duvarı boyunca uzanan moleküllerdir. Arabinoz, mannoz, laktat, süksinat, palmitat, tüberkülostearat içerirler (20,21). LAM T- hücre proliferasyonunun, makrofajların bakterisidal aktivitesinin inhibisyonunda ve TNF- α salınımında görevlidir (22,25). Bir diğer lipid türevidir olan sülfolipidler fagozom inhibisyonuna yol açarak mikobakterilerin hücre içinde varlığını sürdürmesini sağlamaktadır (24). Hücre duvar yapısında ayrıca lipooligosakkaritler (LOS), fenolik glikolipitler, glikopeptidolipitler gibi yüzey molekülleri yer almaktadır. Bu moleküller

de antijenik yanıtta önem taşımaktadır (20,21). Protein yapıdaki antijenlerden olan “purified protein derivative” (PPD), Robert Koch tarafından *M. tuberculosis* kültüründen elde edilen “old tuberculin” proteininin saflaştırılmış halidir. PPD, tüberkülin deri testinde kullanılmaktadır. Ayrıca ısı şok proteinleri olarak bilinen farklı moleküler ağırlıktaki proteinler de immün yanıtta görev almaktadır. Isı şok proteinlerinin otoimmün reaksiyonlarla ilgisi olduğu da düşünülmektedir. 65 kD, 38 kD ve 12 kD ağırlığındaki ısı şok proteinleri *M. tuberculosis* için önem taşıyan proteinlerdir (26).

2.2.3. Mikobakterilerin Üreme Özellikleri

Mikobakteri türlerinin çoğunun üremesi için mineral tuzları, azot kaynağı olarak amonyak veya aminoasitler, karbon kaynağı olarak gliserol gerekmektedir. *Mycobacterium haemophilum* ve *Mycobacterium genavense* gibi bazı türler bunlara ek olarak mikobaktin, hemin ve bazı başka bileşiklere ihtiyaç duyarlar. Yağ asitleri ve karbondioksit mikobakterilerin üremesini uyarıcı yönde etki gösterir. Yağ asitleri yumurta sarısı ya da oleik asit formunda sağlanabilir (20). Oleik asit yüksek konsantrasyonlarda ($\geq 1\%$) toksik etki gösterebileceği için albumin ile nötralize edilmesi gerekir (20, 27). Üreme için optimum sıcaklık değeri türler arasında farklı olup, 30°C'nin altından 45°C'ye kadar değişkenlik gösterir (20).

2.3. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Ernest Runyon 1950'li yıllarda tüberküloz dışı mikobakterileri üreme hızı ve pigment üretimine göre 4 gruba ayırmıştır (4). Bunlar fotokromojenler, skotokromojenler, fotokromojen olmayanlar (nonkromojenler) ve hızlı üreyenler olarak adlandırılmıştır (Tablo 1). Bu sınıflandırmaya göre kolonilerin gözle görünür hale gelmesi için 7 gün veya daha uzun süre gereken mikobakteriler yavaş üreyenler, 7 günden az zaman gerekenler ise hızlı üreyenler olarak tanımlanmıştır (28,29). Buna göre grup I, II ve III yavaş üreyen mikobakterilerden, grup IV ise hızlı üreyen mikobakterilerden oluşmaktadır (30).

Tablo 1. Runyon'un mikobakteri sınıflaması (4)

		Pigment Üretimi		
Runyon Grup	Üreme Hızı	Işıktaki	Karanlıkta	Türler
Grup I Fotokromojenler	Yavaş	+	-	<i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium marinum</i> <i>Mycobacterium simiae</i> <i>Mycobacterium asiaticum</i>
Grup II Skotokromojenler	Yavaş	+	+	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> <i>Mycobacterium szulgai</i> <i>Mycobacterium gordonae</i>
Grup III Fotokromojen olmayanlar	Yavaş	-	-	<i>Mycobacterium avium</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Mycobacterium terrae</i> <i>Mycobacterium gastri</i> <i>Mycobacterium triviale</i> <i>Mycobacterium malmoense</i> <i>Mycobacterium haemophilum</i>
Grup IV Hızlı üreyenler	Hızlı	-	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i> <i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium chelonae</i>

Genetik, hücre yapısı, bilinen ve yeni keşfedilen mikobakteri türlerine ait atipik fenotipik özelliklerle ilgili gelişmelerin artışıyla mikobakteri türleriyle ilgili bilgi düzeyi Runyon sınıflamasının oldukça üzerine çıkmıştır (27). Bunun yanında Runyon sınıflamasının bazı sınırlılıkları da bulunmaktadır. Örneğin *M. kansasii* Grup I içinde yer almaktadır. Ancak karanlıkta pigment oluşturan ya da hiç pigment oluşturmayan *M. kansasii* suşlarının da bulunduğu bilinmektedir. Bazı *M. avium* kompleks suşlarının pigmentli olduğunun

anlaşılması, *M. szulgai* türlerinin 37°C’de skotokromojenik, 25°C’de ise fotokromojenik olması gibi durumlar Runyon sınıflamasının kullanımını oldukça kısıtlamıştır (27, 31).

Moleküler yöntemlerin ve geleneksel olmayan biyokimyasal yöntemlerin kullanımının artmasıyla Runyon sınıflamasının kullanımı azalmıştır. Buna rağmen bazı mikrobiyologlar tarafından TDM türlerinin en azından hızlı üreyen ve yavaş üreyen şeklinde sınıflandırılmasının yararlı olduğu da düşünülmektedir (32).

Runyon sınıflamasının kısıtlılıkları nedeniyle Gail Woods ve John Washington klinik ile daha uyumlu başka bir sınıflama sistemi oluşturmuştur. 1987 yılında yapılan bu sınıflamada TDM’ler insanda potansiyel patojen olanlar ve nadiren hastalık oluşturan saprofit mikobakteriler olarak ikiye ayrılmıştır (Tablo 2). Saprofit olanlar da kendi içinde hızlı, orta hızda ve yavaş üreyenler olarak sınıflandırılmıştır (31).

Tablo 2. Woods ve Washington’un mikobakteri sınıflaması (31)

İnsanda Potansiyel Patojen Olan Mikobakteriler	Nadiren Hastalık Oluşturan Saprofit Mikobakteriler	
<i>M. avium</i> kompleks <i>M. kansasii</i> <i>M. fortuitum</i> grup <i>M. chelonae/M.abscessus</i> grup <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. marinum</i> <i>M.ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i>	Yavaş Üreyenler	<i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i>
	Hızlı Üreyenler	<i>M. thermoresistible</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. parafortuitum</i> kompleks <i>M. phlei</i>
	Orta Hızda Üreyenler	<i>M. flavescens</i>

2.4. TDM'lerin Epidemiyolojisi

2.4.1. Dünyada TDM Epidemiyolojisi

TDM enfeksiyonu prevalans ve insidansının arttığı bilinmesine rağmen dünyada ve ülkemizde TDM'ler ile ilgili epidemiyolojik veri eksikliği bulunmaktadır (1,2,9). Çünkü epidemiyolojik veri elde etmede birtakım zorluklarla karşılaşmaktadır (1). Öncelikle çoğu ülkede TDM'lerin laboratuvar ya da hasta düzeyinde bildirim zorunlu değildir (1, 2, 33). Bu durum da etkili bir sürveyansın yapılmasını, dolayısıyla doğru epidemiyolojik veri elde edilmesini zorlaştırmaktadır. TDM'ler solunum yollarında kolonize olabildikleri için kültürden izole edilen TDM'lerin hastalık etkeni olup olmadığının her zaman net olarak belirlenememesi karşılaşılan bir diğer zorluktur (1,2). Bunun için klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik kanıtların bir arada değerlendirilmesi gerekmektedir (1,9). Ayrıca hastalığın kronik seyri ve yavaş ilerlemesi bazen uygun zamanda örnek alınmasını engellemekte, bu da etkenin izolasyonunu zorlaştırmaktadır (1).

Bu zorluklara rağmen farklı ülkelerde toplumun genelini ya da belli bir kısmını hedef alan, tek ya da çok merkezli çalışmalar sonucunda birtakım veriler elde edilebilmiştir. Bu çalışmaların bir kısmı sadece etkenin laboratuvarında izolasyonu temelinde yapılırken, bir kısmı ise TDM'ye bağlı hastalık temelinde yapılmış çalışmalardır (1,2). Kanada'nın Ontario eyaletinde solunum örneklerinden yapılan izolasyon prevalans çalışmasında izolasyon prevalansının 1997-2003 yılları arasında 9.1/100.000'den 14.1/100.000'e yükseldiği saptanmıştır (33). 1995-2006 arasında İngiltere, Galler ve Kuzey İrlanda'yı kapsayan benzer bir çalışmada izolasyon prevalansının 0.9/100.000'dan 2.9/100.000'a yükseldiği belirlenmiştir (34).

ABD'nin Oregon eyaletinde 2005-2006 yıllarında radyolojik ve klinik verilerin de kullanıldığı bir çalışmada çalışma sonunda hastalık prevalansı 8.6/100.000 olarak bulunmuştur (35). TDM enfeksiyonu bildirim zorunlu olduğu Avustralya'nın Queensland eyaletinde 1999-2005 yılları arasında yapılan çalışmada solunum örneklerinden izole edilen TDM prevalansı incelenen yıllar içinde 100.000'de 5.5'ten 11.2'ye, ATS/IDSA kriterlerini sağlayan TDM enfeksiyonu prevalansının ise 100.000'de 2.2'den 3.3'e yükseldiği saptanmıştır (36). 2000-2008 yılları arasında Tayvan'da bir üniversite hastanesinde yapılan tek merkezli çalışmaya göre hastalık prevalansı incelenen yıllar içinde 100.000'de 1.3'ten 7.9'a yükselmiştir (37). Güney Kore'deki bir çalışmada 2007 yılında hastalık prevalansı

6.7/100.000, hastalık insidansı 6/100.000 iken, 2016'da prevalans 39.6/100.000, insidans ise 19/100.000 olarak belirlenmiştir (38).

Orta Yunanistan'da yapılan tek merkezli bir çalışmada TDM'ye bağlı solunum enfeksiyonu insidansı 2004, 2005 ve 2006'da sırasıyla 100.000'de 0.67, 0.54 ve 0.94 olarak , Girit Adası'nda yapılan toplum tabanlı çalışmada ise 2000-2009 arasında yıllık hastalık oranı 0.6/100.000 olarak bulunmuştur (39,40). Danimarka'da 1997-2008 yılları arasında yapılan çalışmada TDM izolasyonu 100.000'de 2.5, hastalık oranı ise 100.000'de 1.1 olarak belirlenmiştir (41). Hollanda'nın Nijmegen- Arnhem bölgesinde yapılan 1999-2005 arasındaki çalışmada yıllık izolasyon oranı yaklaşık olarak 6.3/100.000, yıllık hastalık oranı da yaklaşık 1.4/100.000 olarak hesaplanmıştır (42). İskoçya'nın Borders bölgesinde 1992-2010 arasında yürütülen çalışmada TDM'ye bağlı akciğer enfeksiyonu için yıllık oran yaklaşık 1.6/100.000 olarak belirlenmiştir (43). 2006-2010 arasında Hırvatistan'da yıllık TDM izolasyon oranı ve ATS kriterlerine göre belirlenen yıllık hastalık oranı sırasıyla 5.3/100.000 ve 0.75/100.000 olarak hesaplanmıştır (44). Fransa'da 2000-2003 yıllarında 32 merkezden toplanan verilere göre HIV negatif bireylerde TDM'ye bağlı akciğer enfeksiyonu yıllık 0.73/100.000, *M. avium* kompleks için ise bu oran 0.2/100.000'dir (45).

Dünya genelindeki çalışmalara bakıldığında en sık izole edilen TDM türleri *M. avium* kompleks türleri olmuştur (1,36,46-49). Brezilya'da Sao Paulo'da 2000-2005 arasındaki çalışmada *M. kansasii* (% 20.8) ve Para eyaletinde 2010-2011'deki çalışmada *Mycobacterium massiliense* (% 44.8) en sık rastlanan türler olmuştur (50,51). Orta Yunanistan'daki 2004-2006 yıllarındaki çalışmada en sık *M. fortuitum* (%62.5), İngiltere'nin Londra şehrindeki 2000-2007 yıllarındaki çalışmada ise en sık *M. kansasii* (%70) saptanmıştır (39,52). *M. xenopi* 2006-2010 arasında Hırvatistan'daki toplum genelinde yapılan çalışmada (%28.1) ve İsrail'de 2004-2010 arasındaki tek merkezli bir çalışmada (%29) en sık rastlanan TDM türü olmuştur (44,53). *M. abscessus* Suudi Arabistan'da 2009-2010 arasında birden fazla merkezin katıldığı çalışmada (%30.6) ve Tayvan'ın Kaohsiung şehrinde 2004-2005 yıllarındaki tek merkezli çalışmada (%44.8) en sık saptanan türdür (54,55).

2.4.2 Türkiye'de TDM Epidemiyolojisi

Dünyadaki çoğu ülkede olduğu gibi ülkemizde de TDM'lerin bildirim zorunluluğu bulunmamaktadır. Ülkemizde şu ana kadar TDM izolasyon oranını, hastalık prevalans veya insidansını belirlemeye yönelik, toplumun genelini ya da risk gruplarını kapsayan bir çalışma

yapılmamıştır. Yapılan çalışmalar genellikle TDM tür dağılımını belirlemeye yönelik ve tek ya da az sayıda merkezin katıldığı çalışmalardır.

2004-2009 yılları arasında Biçmen ve ark. tarafından yapılan tek merkezli çalışmada 19553 hastadan alınan 45891 örnek değerlendirilmiş, 77 hastadan izole edilen 208 (% 2.1) solunum örneğinde TDM saptanmıştır. 31 (%0.16) TDM izolatu enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmiştir. Etken olan türlerin arasında en sık saptanan tür *M. avium* kompleks (%41.9) olup bunu *M. abscessus* (% 16.1) ve *M. kansasii* (% 16.1) izlemektedir (56).

Samsun, Ankara, Malatya ve İstanbul'daki 4 merkezin yer aldığı bir çalışmada 2001-2008 yılları arasında klinik örneklerden üretilmiş 90 TDM izolatu konvansiyonel yöntemler, hsp65 ve 16S rRNA gen bölgelerinin dizi analizi ile tanımlanmıştır. En sık *M. gordonae* (%23.3), *M. abscessus* (% 14.4) ve *M. lentiflavum* (%10) saptanmıştır (57).

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde yapılan bir çalışmada 2004-2010 yılları arasında izole edilen 156 TDM izolatu tür düzeyinde tanımlandığında en sık saptanan türler *M. abscessus* (%44.2), *M. xenopi* (% 16.7) ve *M. peregrinum* (% 10.9) olarak belirlenmiştir. 2012-2016 yılları arasında klinik örneklerden üretilmiş 66 TDM izolatu tür düzeyinde tanımlandığı bir başka çalışmada ise en sık saptanan tür *M. fortuitum* (%62) olup, bunu *M. abscessus* (% 17) ve *M. chelonae* (%9) takip etmektedir (58,59).

Celal Bayar Üniversitesi ve Ege Üniversitesi'nin birlikte yürüttüğü bir çalışmada Nisan 2007-Temmuz 2011 tarihleri arasında tüberküloz ön tanısı ile gönderilen klinik örneklerden izole edilen 101 TDM suşu hsp65 ve 16S rRNA gen bölgelerini hedefleyen dizi analizi yöntemiyle tanımlanmıştır. En sık saptanan türler *M. porcinum* (%39.6) ve *M. lentiflavum* (%35.65) olarak bildirilmiştir (60).

Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda 2009-2010 yıllarında tespit edilen 15 farklı merkezden gönderilen 75 TDM izolatu tür düzeyinde tanımlandığı bir çalışmada en sık saptanan türler *M. fortuitum* (%33.3), *M. abscessus* (% 18.7), *M. gordonae* (% 10.7) ve *M. avium* (%8) olarak belirlenmiştir (61).

Çukurova Üniversitesi'nde Kasım 2012-Eylül 2014 tarihleri arasında gönderilen örneklerden üretilen 93 TDM örneğinin yer aldığı çalışmada hsp65 gen bölgesinin dizi analizi ile tür tayini yapılmıştır. Buna göre en sık saptanan türler sırasıyla *M. abscessus* (%24.7), *M. intracellulare* (% 11.8) ve *M. simiae* (% 10.8) olarak bulunmuştur (62).

Adıyaman Üniversitesi'nde solunum örneklerinden üretilmiş 34 TDM izolatı PZT-RFLP yöntemi ile tanımlanmıştır. En sık saptanan türler sırasıyla *M. intracellulare* (%23.52), *M. gordonae* (%17.64), *M. abscessus* (%17.64) ve *M. simiae* (%17.64) olarak bildirilmiştir (63).

2.5. TDM'lerin Çevreyle İlişkisi ve Bulaş Yolları

TDM'ler hem doğal çevrede, hem de insanlar tarafından oluşturulan ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır. İnsanlarda, çiftlik hayvanlarında ve vahşi hayvanlarda hastalığa neden olmaktadır (6). Sindirim, solunum ve deriden temas bilinen bulaş yollarıdır (6,9).

TDM'lerin bulaştığı doğal kaynaklardan biri toprak olarak bilinmektedir. Özellikle çam ormanlarında bulunan asidik topraklar ve kıyı bölgelerindeki bataklık toprakları önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Ayrıca tarımda, bahçecilikte kullanılan topraklar ve saksı topraklarından çıkan tozlar da bilinen çevresel kaynaklar arasındadır (5,6,64,65). TDM'lerin düşük pH'da yaşama özelliğinin bu ortamlara uyumunu artırdığı bilinmektedir. Bunun yanında bu topraklarda yüksek miktarda bulunan humik ve fulvik asit gibi maddelerin TDM üremesini uyarıcı yönde etki ettiği bildirilmiştir (5,64). TDM'lerin lipitten zengin dış membranları sayesinde yüzey ve partiküllere tutunmada rol oynaması da toprağa uyumunu kolaylaştıran bir özelliktir. TDM'ler topraktan aerosollerin solunması ile bulaşarak enfeksiyon oluşturmaktadır (5).

Su kaynakları TDM'ler için bir diğer önemli bulaş kaynağıdır. TDM'lerden zengin toprak ve bataklıklardan drene olan sular risk oluşturmaktadır. Bu suların içme suyu olarak kullanılması ile insanlara bulaş gerçekleşmektedir (64,66). Lipitten zengin dış membranları sayesinde TDM'ler yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturmada, sulardaki amipler tarafından fagosite edildiklerinde yaşamlarını sürdürmektedirler (5,64,67,68). TDM'ler hidrofobik hücre yüzeyi nedeniyle içme suyu sistemlerinin borularına tutunabilmektedir (69). Hem biyofilm oluşturmaları hem de membran yapıları nedeniyle dezenfektanlara gösterdikleri direnç TDM'lerin su sistemlerinde varlığını sürdürmelerini sağlamaktadır (70,71). İçme sularının dışında duş sistemleri, jakuziler, kapalı yüzme havuzları ve oda içi nemlendirme cihazları da TDM'lerin aerosol yoluyla bulaşması için uygun kaynaklardır (5,64,72). Ev içi kaynakların dışında işyerleri, spor salonları, çeşmeler, soğutma kuleleri, nehir ve şelaleler de TDM için kaynak oluşturmaktadır (64). Okyanus suları ise yüksek tuz oranı nedeniyle TDM üremesi için uygun olmayan bir ortamdır (5,64).

Hastane ortamında da TDM'ler bulaşabilmektedir. Endoskopi ünitelerindeki endoskoplar, musluk başlıkları ve yıkama suları TDM'ler için uygun üreme ortamlarıdır (73,74). Kalp ameliyatlarında kullanılan ısıtıcı-soğutucu cihazlar da TDM bulaşına bağlı enfeksiyonlardan sorumlu tutulmuştur (75,76).

İnsandan insana TDM bulaşı çok nadiren olmaktadır. İngiltere'deki bir çalışmada iki *M.kansasii* olgusunda bulaşa çevresel herhangi bir kaynak bulunamamış, insandan insana bulaşabildiği gösterilmiştir (77).

TDM'lerin bulaş kaynağının kontrol altına alınması, birtakım koruyucu önlemlerle bulaşın engellenmesi mümkündür. Sıcak su elde etmek için kullanılan su ısıtma cihazlarının sıcaklığının en az 55°C'ye yükseltilmesi önerilmektedir. Musluk ve duş başlıklarında por çapı < 0.45 µm olan bakteriyolojik filtrelerin kullanılması da gerekli görülmektedir (64). Kuyu suyu gibi yer altı sularının boruyla suların taşındığı sistemlere göre daha az yoğunlukta TDM içerdiği bildirilmiştir, bu nedenle kuyu suyu kullanımı da önerilen önlemler arasındadır (64,78). Evlerde bulunan duş başlıklarının çamaşır suyu ile 30 dakika dezenfekte edilmesi gerekmektedir. Buhar oluşumunun azaltılması ve aerosol yoluyla bulaşın engellenmesi için büyük delikleri bulunan duş başlıklarının kullanılması, banyoların havalandırılması önerilmektedir. İçme ve yemek pişirme için kullanılan sular TDM'lerin ölmesi için 100°C'de 10 dakika kaynatılmalıdır. Bahçe işleriyle uğraşırken toz inhalasyonundan kaçınılmalı, bahçede ve saksıdaki topraklar nemlendirilmelidir (64).

2.6. TDM'lerin Tanısı

2.6.1. TDM'lerin Klinik Tanısı

2007 yılında ATS ve IDSA tarafından TDM'lerin neden olduğu akciğer enfeksiyonlarının tanısı ve tedavisi için bir rehber yayınlanmıştır (9) . Bu rehberde klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik kriterler yer almaktadır (Tablo 3). TDM enfeksiyonu tanısı koyabilmek için TDM'nin mikrobiyolojik olarak izolasyonu tek başına yeterli değildir. Klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik kriterler eşit olarak önem taşımaktadır ve tüm kriterlerin sağlanması gerekmektedir (9,79).

Tablo 3. TDM akciğer enfeksiyonu tanısında kullanılan klinik ve mikrobiyolojik kriterler (9)

Klinik Kriterler	Mikrobiyolojik Kriterler
<p>1. Solunum yollarıyla ilgili semptomlar, akciğer grafisinde nodüler ve kaviter opasiteler veya yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografide (HRCT) çok sayıda küçük nodülle birlikte multifokal bronşiektezinin görülmesi</p> <p>2. Diğer tanıların dışlanması</p>	<p>1. En az iki farklı ekspektore balgam örneğinden yapılan kültürde pozitiflik (Başlangıçtaki örnekler tanı koymak için yeterli değilse ARB yayma ve kültür tekrarı düşünülmelidir.)</p> <p>veya</p> <p>2. En az bir bronş yıkama veya bronş lavaj örneğinden yapılan kültürde pozitif sonuç</p> <p>veya</p> <p>3. Transbronşiyal veya diğer akciğer biyopsilerinde mikobakteriyel histopatolojik değişiklikler (granülomatöz inflamasyon ya da ARB) görülmesi ve TDM kültür pozitifliği veya akciğer biyopsisinde mikobakteriyel histopatolojik değişiklikler ile birlikte bir veya daha fazla balgam ya da bronş lavaj kültüründe TDM saptanması</p> <p>4. Nadir saptanan veya sıklıkla çevresel kontaminasyonla ilişkili TDM'ler ürettiğinde uzman görüşü alınmalıdır.</p> <p>5. TDM'ye bağlı akciğer enfeksiyonundan şüphelenilen ancak tanı kriterlerini karşılamayan hastalar kesin tanı konulana ya da dışlanana kadar takip edilmelidir.</p> <p>6. TDM'ye bağlı akciğer enfeksiyonu tanısının konması her zaman tedavi başlanmasını gerektirmez. Hastanın durumuna göre potansiyel riskler ve tedaviden göreceği yarar gözetilerek karar verilmelidir.</p>

Bu kriterler en iyi MAK, *M. kansasii* ve *M. abscessus* ile oluşan enfeksiyonlarda uyum göstermektedir. Diğer TDM'ler ile oluşan solunum yolu enfeksiyonlarda bu kriterlerin uygulanabilirliğine dair yeterince bilgi bulunmamaktadır (9). Bununla birlikte TDM türlerini, ilaç direncini tespit eden moleküler yöntemler ve TDM akciğer enfeksiyonlarındaki antibiyotik tedavisiyle ilgili gelişmeler meydana gelmiştir. Bu nedenle kanıta dayalı olarak düzenlenerek güncellenmiş rehberlere ihtiyaç bulunmaktadır (79).

2.6.2. TDM'lerin Mikrobiyolojik Tanısı

2.6.2.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Mikobakteriyolojik incelemeler için farklı örnek tipleri tercih edilebilir. Bunların büyük kısmını balgam, trakeal ve bronşiyal aspirat, bronkoalveolar lavaj (BAL) gibi solunum yollarından alınan örnekler oluşturmaktadır. Bunun dışında açlık mide sıvısı, doku, biyopsi örnekleri ve beyin omurilik sıvısı (BOS), plevral ve perikardiyal aspirat gibi steril vücut sıvıları da bu amaçla tercih edilen örnekler arasındadır (20,27,80). Kan ve dışkı gibi örnekler ise genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda tercih edilmektedir (20).

Örnekler mümkünse antibiyotik tedavisi başlamadan, aseptik şartlarda alınmalıdır. Etkenin izolasyon olasılığını artırmak için uygun kalitede, yeterli miktarda ve sayıda örnek alınmalıdır. Örnek uygun zamanda alınarak, en kısa sürede ve uygun koşullarda taşınarak laboratuvara gönderilmelidir (80). Örnek kabı olarak fiksatif içermeyen, steril, sızdırmaz, tek kullanımlık, uygun şekilde etiketlenmiş, laboratuvar tarafından onaylanmış kaplar tercih edilmelidir (20). Musluk suyu gibi çevresel kaynaklar mikobakteri içerebileceği için örnek alımında kontaminasyondan kaçınılmalıdır. Örneklerin laboratuvarında çalışılması 1 saatten uzun sürecekse kan dışındaki örneklerin işlenene kadar buzdolabında, 4 °C'de bekletilmesi önerilmektedir. Sürüntü örnekleri hem az miktarda örnek içermesi, hem de mikobakterilerin hücre duvarının hidrofobik özelliğinin sürüntü çubuğundan besiyerlerine aktarımı zorlaştırması nedeniyle tercih edilmemelidir (9,20).

Örneklerin işlenmesi steril örnek olup olmamasına göre farklılık göstermektedir (80). Steril olmayan örnekler farklı türde mikroorganizmalar ile müsin ve hücrelerden oluşan kompleks bir organik matriks içermektedir (20). Steril olmayan alanlardan alınan örneklerde bulunan mikroorganizmalar TDM'lerden hızlı üreyerek mikobakterilerin kültürden izolasyonunu zorlaştırabilir. Steril olmayan örneklere hem kontaminasyonu, hem de bakteri

ve mantarların aşırı üremesini en aza indirmek için dekontaminasyon ve homojenizasyon gibi işlemler uygulanmalıdır (9). BOS, eklem sıvısı ve diğer steril vücut sıvıları, kan, kemik iliği, aseptik olarak alınmış doku ve biyopsi örnekleri steril örnekler olup bu örneklerle dekontaminasyon uygulanmaz (80).

Dekontaminasyon işlemiyle örneklerdeki mikobakterilerin canlılığı korunurken, kontaminant mikroorganizmaların çeşitli kimyasallar ile uzaklaştırılması sağlanır. Homojenizasyon işlemiyle mukus ve epitel yapılarının parçalanıp santrifüjde çöktürülerek açığa çıkan mikobakterilerin homojen olarak dağılımı amaçlanır. Mikobakteriler için en uygun pH değeri 6.8 olduğu için eklenen kimyasallar ile asidik ya da alkali duruma gelen örneğin fosfat tampon solüsyonlarıyla nötralizasyonu yapılmalıdır. Örnekteki mikobakterilerin yoğunlaştırılarak izolasyonunu artırmak için santrifüj ile konsantrasyon sağlanmalıdır (80).

Sodyum hidroksit (NaOH) bakteriler için toksik özelliği olan, dekontamine edici ve mukolitik özelliği olan bir kimyasaldır (20,81). Mukolitik ajan olarak N-asetil-L-sistein (NALC) eklenmesi, dekontaminasyon için gereken NaOH konsantrasyonunu ve süreyi kısaltır. Sodyum sitrat örnekteki ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'nin inaktivasyonunu engeller. NaOH ile uzun süreli temas mikobakterilerin de ölümüne neden olabileceği için NaOH solüsyonu eklenen örnek 15 dakikadan fazla bekletilmemelidir. NaOH konsantrasyonu laboratuvarın kontaminasyon oranı takip edilerek ayarlanmalıdır (81). Normalde bu değer katı besiyerleri için % 3-5, sıvı besiyerleri için % 5-10 arasında olmalıdır (80). Bu aralığın altına düşmesi halinde NaOH konsantrasyonu azaltılmalı, üzerine çıkarsa artırılmalıdır (81).

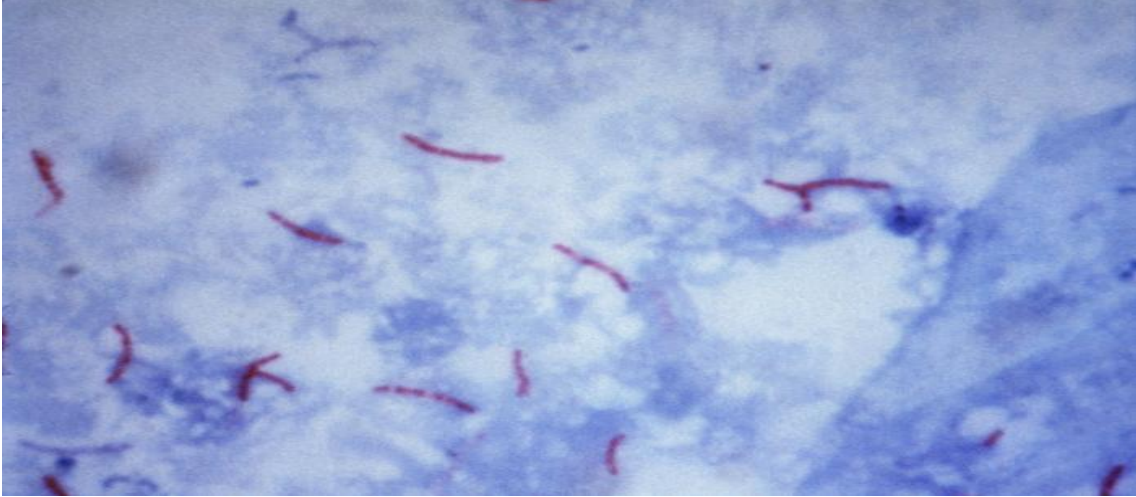
NALC-NaOH yönteminin dışında Petroff yöntemi adı verilen, sadece NaOH kullanılan bir yöntem daha bulunmaktadır (80,81). Bu yöntemde NALC kullanılmadığı için daha yüksek konsantrasyonda NaOH gerekmektedir. Dekontaminasyon amacıyla kullanılan bir diğer yöntem oksalik asit yöntemidir. Daha önce kistik fibrozisli hastalardan alınan solunum örneklerinde dekontaminasyon amacıyla kullanılmıştır (81). Daha az mikobakterisidal aktiviteye sahip olan bu yöntem özellikle *Pseudomonas* türleri ile kontamine örneklerde NALC-NaOH yöntemi ile birlikte kullanılabilir. Dekontaminasyon süresinin takip edilemediği durumlarda Zefiran-trisodyum fosfat yöntemi kullanılabilir (80). Zefiran bir kuarterner amonyum bileşiği olup, beraberindeki trisodyum fosfat kontaminantlar için seçici toksisite gösterir (20).

Bazı dekontaminasyon yöntemlerinin kullanılan otomatize sıvı kültür sistemleriyle uyumsuz olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle ticari kültür sistemi üreticileri tarafından önerilen dekontaminasyon yöntemlerinin kullanımı da önem taşımaktadır (82).

2.6.2.2. Mikroskopik İnceleme

Mikobakterilerin laboratuvar tanısında kullanılan mikroskopik inceleme basit, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Yöntemin duyarlılığı uygulanan tekniğe, uygulayan ve değerlendiren kişilerin deneyimine göre % 20-85 arasında değişmektedir. Preparatta pozitiflik saptayabilmek için örneğin mililitresinde en az 5.000-10.000 basil bulunmalıdır (80).

Mikobakteriler hücre duvarlarındaki yüksek miktardaki mikolik asit içeriği nedeniyle zor boyanan mikroorganizmalardır. Gram boyama gibi suda çözünen boyaların kullanıldığı yöntemler etkisiz kalmaktadır (81). Mikobakterilerin boyanmasında karbol fuksin yöntemleri ve florokrom yöntemleri kullanılmaktadır. Karbol fuksinli boyama yöntemleri laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan yöntemler olup, Kinyoun ve Erlich Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemleri denen iki farklı ARB boyama yöntemidir. İki yöntemin bazik fuksin ve fenol konsantrasyonlarında farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca EZN yönteminde Kinyoun yönteminden farklı olarak ısıtma uygulanmaktadır. Bunların dışında her iki yöntemde de ışık mikroskopunda mavi zeminde kırmızı basiller aranmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Mikobakterilerin EZN boyanma görüntüsü (83)

ARB boyama yönteminin bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Negatif sonuç mikobakteri enfeksiyonunu dışlamamaktadır. Ayrıca bu yöntem ile canlı/ölü basil ayrımını yapmak mümkün değildir (80). Aside dirençli boyanma özelliği mikobakteriler dışındaki

mikroorganizmalarda da görülmektedir. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Legionella micdadei*, *Cryptosporidium* türlerinin kistleri, *Isospora* ve diğer microsporidia türleri de değişen derecelerde aside dirençli boyanma özelliği göstermektedir. ARB boyama yöntemiyle *M. tuberculosis* kompleks-TDM ayırımı yapılamamaktadır (81).

Mikobakteriler tek başına auramin-O ile veya auramin-O ve rhodamin-B denilen floresan boyaların birlikte kullanılmasıyla da boyanabilir (20,80,81). Florokrom boyama yönteminde karanlık zeminde sarı/turuncu floresan veren basiller aranmaktadır (80). Floresan mikroskop gerektirmesi nedeniyle maliyeti ışık mikroskopunun kullanıldığı karbol fuksinli yöntemlere göre daha yüksektir (20). Buna rağmen daha küçük objektiflerle geniş alanları tarama olanağı sağlaması değerlendirme süresini kısaltmaktadır. Karbol fuksinli yöntemlere göre duyarlılığı daha yüksek, özgüllüğü ise daha düşüktür. Yalancı pozitiflik olasılığı nedeniyle karbol fuksinli boyamalarla doğrulama gerektirmektedir. Floresan boyaların solması nedeniyle kısa sürede değerlendirme gerekliliği, boyaların kanserojen özellik taşıması yöntemin diğer kısıtlı yönleridir (80).

Mikroskopik değerlendirme yapılırken negatif sonuç verebilmek için ışık mikroskobu ile preparatta en az 300 alan, floresan mikroskop ile 250'lik büyütmede en az 30, 400'lük büyütmede en az 70 alan incelenmelidir (80). Pozitif sonuçlar her alanda görülen basil sayısına göre derecelendirilmektedir (Tablo 4).

Tablo 4. Preparat değerlendirme Kriterleri (80,84)

	Aside dirençli boyanan basil sayısı		
	Karbol fuksin boyama	Florokrom boyama	
Büyütme oranı	x1000	x250	x400
Negatif	0	0	0
Şüpheli (tekrar edilmeli)	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
1+	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
2+	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
3+	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
4+	> 9/1 alan	> 90/1 alan	> 36/1 alan

2.6.2.3. Kültür Yöntemleri

Mikobakterilere bağlı enfeksiyonların tanısında kültür altın standart yöntemdir (80,85). Mikobakterilerin üremesi, tanımlanması, ilaç duyarlılık testlerinin çalışılması ve epidemiyolojik çalışmaların yapılabilmesi için kültüre gereksinim vardır (80). Kültürde mikobakterilerin saptanabilmesi için örnekte 10-100/ml canlı basilin bulunması yeterlidir (20,80,84). Mikobakterileri kültürden izole etmek amacıyla katı ve sıvı besiyerlerinin birlikte kullanımı önerilmektedir (80,81). Mikobakteri kültürü için kullanılan katı besiyerleri temel olarak yumurta bazlı ve agar bazlı besiyerleri olarak incelenebilir. Bunların dışında bazı antimikrobiyal ajanların eklenmesiyle üretilen seçici besiyerleri de bulunmaktadır (20,27).

2.6.2.3.1. Yumurta Bazlı Besiyerleri

Tam yumurta veya yumurta sarısı, tuzlar, patates unu ve gliserol içeren opak görünümde besiyerleridir (20,27,80,81). Mikobakterilerin büyük bölümünün üremesini desteklemesi, raf ömrünün uzun olması ve iyi bir tampon kapasitesinin olması bu besiyerlerinin en önemli avantajlarıdır. Besiyerinin kalitesinin yumurta kalitesine göre değişmesi, ilaç duyarlılık testlerinde konsantrasyon ayarının tam olarak yapılamaması, bazen besiyerine ekilen örnek ile koloni ayrımının yapılmasında zorluk yaşanması yumurta bazlı besiyerlerinin dezavantajlarıdır (20).

Laboratuvarlarda en sık kullanılan yumurta bazlı besiyeri Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeridir. İçeriğinde bulunan malaşit yeşilinin konsantrasyonu diğer mikroorganizmaların üremesini engellerken mikobakterilerin üremesini sağlayacak şekilde ayarlanmıştır. Bir diğer yumurta bazlı besiyeri olan Petragnani besiyerinde LJ besiyerinin yaklaşık 2 katı konsantrasyonda malaşit yeşili bulunmaktadır. Bu özelliği nedeniyle çok fazla kontamine olan örneklerde kullanılmaktadır. Amerikan Trudeau Society besiyeri ise LJ besiyerine göre daha düşük konsantrasyonda malaşit yeşili içerir. Bu nedenle kontaminasyon oranı daha yüksektir. Bununla birlikte mikobakteriler üzerindeki inhibisyon da azaldığı için bu besiyerinde mikobakteri kolonileri daha erken sürede saptanmaktadır (20).

2.6.2.3.2. Agar Bazlı Besiyerleri

Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 adı verilen agar bazlı besiyerleri ortak olarak tuzlar, vitaminler, kofaktörler, albumin, katalaz, gliserol ve malaşit yeşili içermektedir. Farklı olarak Middlebrook 7H10 besiyerinde oleik asit ve glikoz, Middlebrook 7H11 besiyerinde ise

ek olarak % 0.1 kazein hidrolizati bulunmaktadır. Kontaminant mikroorganizmaların daha zor üremesi ve kolonilerin daha erken tespit edilmesi yumurta bazlı besiyerlerine göre en önemli avantajlarıdır (20,81). Daha yüksek maliyetli olması ve raf ömrünün daha kısa olması ise dezavantajlarıdır. Aşırı ısı ve ışığa maruziyet besiyerinin bozularak mikobakteriler için toksik bir madde olan formaldehit salınımına neden olabilir. Bu nedenle besiyerinin hazırlanması, inkübasyonu ve saklanması aşamalarında dikkatli olunmalıdır. Şeffaf görünümde besiyerleri olup, üreyen koloniler ekilen örnekten kolaylıkla ayırt edilmektedir (20).

Middlebrook besiyerlerinde bulunan gliserol MAK üyelerinin üremesini uyarıcı yönde etki göstermektedir. Eğer *M. bovis* etken olarak düşünülüyorsa Middlebrook 7H10 besiyerine % 0,2 pirüvik asit eklenmesi önerilmektedir. Niasin üretimini artırmak için ise % 0,25 L-asparajin ve % 0,1 potasyum aspartat eklenmesi gerektiği bildirilmiştir. Middlebrook 7H11 besiyerinde bulunan kazein hidrolizati izoniazid dirençli *M. tuberculosis* suşlarının izolasyonuna olumlu yönde etki etmektedir (20).

2.6.2.3.3. Seçici Besiyerleri

Besiyerlerine antimikrobiyal ajanların eklenmesiyle bakteri ve mantarların oluşturduğu kontaminasyonun azaltılarak, mikobakterilerin seçici olarak üremesi amaçlanmıştır (20,27). Gruft tarafından tanımlanan LJ Gruft besiyeri penisilin, nalidiksik asit ve ribonükleik asit (RNA) eklenmiş bir LJ besiyeridir (20,27,86). Yine aynı amaçla Petran tarafından tanımlanan Mikobaktosel LJ besiyerinde ise sikloheksimid, linkomisin ve nalidiksik asit bulunmaktadır (20,27). Mitchison balgam örneklerinin dekontaminasyon işlemine gereksinim duyulmadan ekilebilmesini amaçlayan seçici bir besiyeri tasarlamıştır. Bunun için oleik asit agar besiyerine karbenisilin, polimiksin, trimetoprim laktat ve amfoterisin B eklenmiştir (27). Karbenisilin özellikle *Pseudomonas* türlerinin üremesini engellemek amacıyla eklenmiştir (20). Daha sonra McClatchy tarafından oleik asit yerine Middlebrook 7H11 besiyeri kullanılarak ve karbenisilin konsantrasyonunu düşürülerek seçici 7H11 ya da S7H11 denen besiyeri tanımlanmıştır (27).

Son yıllarda özellikle *M. abscessus* gibi hızlı üreyen TDM türlerinin izolasyonunu kolaylaştırmak amacıyla RGM besiyeri adındaki besiyeri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Kistik fibrozis, akciğer transplantasyonu hastaları ve bronşiektazili hastalar gibi farklı hasta gruplarında yapılan çalışmalarda hızlı üreyen TDM türlerinin yüksek duyarlılıkla çalıştığı

gösterilerek, hızlı üreyen TDM türlerinin kültürü için alternatif bir besiyeri olabileceği bildirilmiştir (87–89).

2.6.2.3.4. Otomatize ve Yarı Otomatize Sistemler

İlk kez 1980 yılında BACTEC 460 radyometrik sistem (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) ile mikobakterilerin kültürden izolasyonu ve *M. tuberculosis* için ilaç duyarlılık testlerinin çalışılması için sıvı besiyerlerinin kullanımı başlamıştır. Bu sistem üremenin tespit edilebilmesi için karbon-14 ile işaretli palmitik asit kullanan bir yarı otomatize sistemdir. Bu yöntemin kullanıma girmesiyle mikobakterilerin daha erken ürediği gözlenmiş ve katı besiyerlerine göre pozitif kültür sayısında da artış olmuştur (27,81,90). Ancak iğneyle inokülasyon sırasında çapraz kontaminasyon riski bulunması ve radyoaktif madde kullanımı gerektirmesi nedeniyle bu yöntemin kullanımına son verilmiştir (27,81,91).

Günümüzde radyometrik yöntemeye dayanmayan otomatize sıvı kültür sistemleri tercih edilmektedir. Bu yöntemler çapraz kontaminasyon riski daha az, kullanımı daha kolay, devamlı monitörizasyon sağlayan ve elektronik veri akışına izin veren sistemlerdir. BACTEC MGIT (*Mycobacteria* Growth Indicator Tube) 960 sistemi (Becton Dickinson Microbiology Systems) MGIT adı verilen modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren tüpler kullanan otomatize bir sistemdir (20). MGIT tüplerinin en alt kısmında silikona gömülü olarak bulunan floresan özellikli rutenyum pentahidrat içeren bir oksijen sensörü bulunmaktadır. Bu sensör tüpteki oksijen varlığına duyarlı olup, başlangıçta yüksek miktarda olan oksijen mikroorganizmalar tarafından tüketilince konsantrasyonu azalır. Bunun sonucunda sensör üzerindeki inhibisyon azalır ve floresan salınımı gerçekleşir (20,81). BACTEC MGIT 960 sistemi tüpteki floresan düzeyini devamlı olarak takip eder, floresan artışlarını üreme indeksi-*growth unit* (GU) olarak kaydeder. GU değeri belli bir eşiğin üzerine çıktığında tüpten pozitif sinyal alınır (81).

MGIT tüpleri inkübe edilmeden önce OADC (oleik asit, albumin, dekstroz ve katalaz) karışımı ve kontaminantların üremesini engellemek için PANTA (polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin) karışımı eklenir (20,27). OADC karışımında bulunan oleik asit mikobakterilerin metabolik olarak uyarılmasını sağlar. Albumin toksik özellikteki serbest yağ asitlerini bağlar. Dekstroz mikobakteriler için enerji kaynağı olarak kullanılır. Katalaz ise besiyerinde bulunabilecek toksik peroksitleri bağlamakla görevlidir (27,92). MGIT 960 sistemindeki kontaminasyon oranı BACTEC 460 sistemine göre daha

yüksektir. Bu durumun OADC karışımının kontaminant mikroorganizmalar tarafından da kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (20). Bunun dışında kan ve kanlı örneklerin floresan oluşumunu maskeleyesi ve yöntemin bazı dekontaminasyon yöntemleriyle olan uyumsuzluğu diğer dezavantajlarıdır (20,82).

VersaTREK sistemi (VersaTREK Diagnostic Systems) mikroorganizmaların metabolik aktivitesi sonucu gaz üretimi veya tüketimine bağlı olarak şişelerdeki besiyerinin üst kısmında bulunan boşluktaki gaz basınç değişimini ölçen bir diğer otomatize sistemdir. MB/BacT Alert 3D (bioMérieux) sistemi ise mikobakteri üremesini karbondioksit düzeyini kolorimetrik olarak ölçen sensörlerle takip etmektedir (20,27).

Katı ve sıvı besiyerlerinin birlikte kullanılması mikobakterilerin izolasyonu açısından avantajlıdır. Bazı mikobakteri türleri sıvı besiyerinde üremediği için mutlaka bir katı besiyerine ekim yapılmalıdır. Ayrıca katı besiyerleri aynı örnekte birden fazla mikobakteri türünün ürediği durumlarda farklı türlerin ayırt edilebilmesi olanağı sağlamaktadır. Sıvı besiyerlerindeki kontaminasyon oranının yüksek olması da katı besiyerlerinin de kullanımını gerekli kılmaktadır (20).

Mikobakteri türleri için genel olarak ideal üreme sıcaklığı 35°C-37°C arasındadır. *M. ulcerans*, *M. chelonae*, *M. haemophilum* ve *M. marinum* gibi bazı mikobakteri türleri ise daha düşük sıcaklık değerlerinde daha iyi üremektedir (20,27). Özellikle deri ve yumuşak doku örneklerinden yapılan kültürlerde bu etkenlerden şüpheleniliyorsa ikinci bir besiyeri setinin 25°C-33°C arasında inkübe edilmesi önerilmektedir. Daha düşük sıcaklık değerleri mikobakteri üreme süresini uzatmaktadır. Yeni otomatize sıvı kültür sistemleri 35°C-37°C sıcaklık aralığı dışındaki sıcaklıklarda inkübasyona izin vermemektedir (20).

2.7. TDM'lerin Tür Düzeyinde Tanımlanması

Tedavide kullanılan antimikrobiyal ajanların duyarlılıklarının türe göre değişmesi nedeniyle TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanmasının klinik olarak önemi giderek artmaktadır (9,93). TDM türlerinin klinik olarak önemli olma olasılığını artıran bazı faktörler bulunmaktadır. Çok sayıda ya da farklı bölgelerden alınan örneklerde üreme olması, örnekteki mikobakteri miktarının fazla olması (ARB pozitif örnek olması), kan gibi normalde steril olan örneklerde TDM üremesi üreyen TDM'nin klinik olarak önemli olma olasılığını artırmaktadır. Bunun gibi ipuçlarına rağmen tür düzeyinde tanımlama olmadan üreyen TDM'nin klinik

olarak önemli olup olmadığını anlamak zordur, bu nedenle tür düzeyinde tanımlama yapılmalıdır (9).

TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanması için geçmiş yıllarda kolonilerin kültürdeki özellikleri ve biyokimyasal analizleri içeren fenotipik yöntemler kullanılmıştır (84,94). Ancak bu yöntemler tekrarlanabilirliğinin düşük olması, uygulamasının çok zaman alması ve ayırıcı özelliğinin az olması nedeniyle artık pek kullanılmamaktadır. Moleküler yöntemler günümüzde mikobakteri türlerinin tanımlanması için laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntemler olmuştur (94).

2.7.1.Fenotipik Testler

TDM'lerin fenotipik tanısında kilit rol oynayan özellikler üreme hızı, optimum üreme sıcaklığı, koloni morfolojisi, pigmentasyon gibi üreme özellikleri ve bazı biyokimyasal özelliklerdir (27). Biyokimyasal testler günümüzde artık pek kullanılmamaktadır. Ancak kaynakların sınırlı olduğu, moleküler yöntemlerin sadece referans laboratuvarlarda kullanıldığı ve eğitilmiş teknik personel miktarının yeterli olmadığı ülkelerde TDM tür tanımlaması için bu testler önem taşımaktadır (93).

TDM'lerin tanımlanmasında test edilen başlıca biyokimyasal özellikler niasin birikimi, nitratların nitritlere indirgenmesi, tween-80 hidrolizi, katalaz, arilsülfataz, üreaz, pirazinamidaz gibi enzimlerin aktiviteleri, demir alımı, tiofen-2 karboksilik asid hidrazid (T2H) ile üremenin engellenmesi, tellürit indirgenmesi, %5 sodyum klorür (NaCl) varlığında üreme, MacConkey agarda üreme gibi özelliklerdir (Tablo 5) (27,81,93).

Arilsülfataz testi: Arilsülfataz, sülfat ile tripotasyum fenolftaleinin aromatik halkaları arasındaki disülfat bağlarını parçalayan enzimdir. 3 veya 14 günlük inkübasyondan sonra açığa çıkan serbest fenolftalein ortama eklenen alkali bir madde olan sodyum karbonat nedeniyle kırmızı-pembe renk oluşturur (81,93). Arilsülfataz aktivitesi hızlı üreyen mikobakteriler ile grup-III fotokromojen olmayan mikobakteriler arasındaki ayırıcı tanıda yardımcı olmaktadır. Hızlı üreyen mikobakterilerde test pozitifdir (81). Bununla birlikte *M. marinum*, *M. xenopi*, *M. szulgai* ve *M. kansasii* gibi yavaş üreyen mikobakterilerde de az miktarda enzim üretilebilmektedir. Ancak bu enzim üretimi her zaman pozitif reaksiyon oluşturacak düzeyde değildir (27).

Katalaz testi : Katalaz enzimi, hidrojen peroksiti parçalayarak oksijen ve suya ayırıştırır. Açığa çıkan oksijen nedeniyle oluşan baloncuklar testin pozitif olduğu anlamına gelmektedir. Mikobakterilerin tanısında katalaz, ısıya dirençli katalaz varlığının tespiti ve katalaz aktivitesinin ölçümü olmak üzere iki farklı testte kullanılmaktadır (81,93). 68°C’de 20 dakika ısıtıldıktan sonra çoğu mikobakteri türü katalaz pozitif reaksiyon vermektedir. Bu test için %30 hidrojen peroksit ve %10 tween-80 kullanılmaktadır. Kullanılan tween-80 deterjan özelliği taşımakta olup, hidrofobik olan ve kümelenen mikobakterilerin birbirinden ayrılmasını ve katalaz oluşumunun artmasını sağlamaktadır. İzoniazid dirençli bazı suşlar dışındaki *M. tuberculosis* suşlarının büyük kısmı ve diğer MTK suşları ısıya dirençli katalaz açısından negatiftir. Katalaz aktivitesi ise test edilmek istenen kolonilerin ürettiği LJ besiyeri içeren tüplere hidrojen peroksit eklenerek oluşan gaz kabarcıklarının yüksekliği ölçülerek uygulanan yarı kantitatif bir testtir. Tüpteki kabarcıkların 45 mm’den fazla yüksekliğe ulaşması güçlü pozitif reaksiyon anlamına gelmektedir (27,81,93).

Niasin akümülyasyon testi: Mikobakteri türleri metabolik aktiviteler sırasında niasin üretirler (27,81). Ancak *M. tuberculosis* ve *M. simiae* enzim eksikliği nedeniyle niasini niasin ribonükleotidlere dönüştüremez. *M. africanum*, *M. bovis*, *M. marinum* ve *M. chelonae* türlerine ait bazı suşlarda da bu eksiklik gözlenmiştir. Biriken niasin kültürün yapıldığı besiyerinde tespit edilebilmekte, başta *M. tuberculosis* olmak üzere bazı mikobakteri türlerinin ayırıcı tanısında yararlı olmaktadır. Bu test için kullanılan siyanojen bromidin oldukça toksik özellik taşıması nedeniyle içine reaktif madde yerleştirilmiş şerit kağıtlar üretilmiştir (27). Reaktif içeren şerit kağıtla inkübe edilen besiyerinde sarı renk oluşumu pozitif reaksiyon anlamına gelmektedir (27).

Nitratların nitritlere indirgenmesi: Bazı mikobakteri türleri nitratın nitrite indirgenmesini sağlayan nitrat redüktaz enzimini üretmektedir. Test edilen izolata ait ekstrakta sülfanilik asit ve N-naftil etilendiamin eklenmesiyle kırmızı renk oluşumu nitrit oluşumunu gösterir ve pozitif reaksiyon anlamına gelmektedir. *M. tuberculosis*, *M. kansasii* ve *M. szulgai* türleri gibi nitrat redüktaz üreten türlerin tanısında önem taşıyan bir testtir (27).

Pirazinamidaz testi: Belli mikobakteriler tarafından üretilen pirazinamidaz enzimi pirazinamidin (PZA) deaminasyonu ile pirazinoik asit ve amonyak açığa çıkarır. Ferröz amonyum sülfat eklenmesiyle besiyerinde kırmızı bant oluşumu pozitif reaksiyon anlamına

gelmektedir (27,81). Çoğu mikobakteri türü için pozitif olan bu test niasin için zayıf pozitif *M. bovis* ile *M. tuberculosis* ayrımında yararlı bir testtir (27). Bunun dışında *M. tuberculosis* için PZA direncinin tespiti için de kullanılan bir testtir (81).

NaCl tolerans testi: *M. triviale* için 28°C sıcaklıkta %5 NaCl içeren yumurta bazlı besiyerinde üreyebilme özelliği karakteristik bir özelliktir. Bunun dışında *M. flavescens*, *M. abscessus* ve *M. fortuitum* gibi TDM'ler de bu özelliği gösterebilmektedir (27,95).

T2H ile üremenin engellenmesi: T2H ile inhibisyon niasin pozitif *M. bovis* ile *M. tuberculosis* ve yavaş üreyen fotokromojen olmayan mikobakterilerden ayrımında önem taşımaktadır. T2H ile *M. bovis* türünün üremesi inhibe olurken, *M. tuberculosis* ve yavaş üreyen mikobakterilerin çoğu T2H eklenmiş besiyerinde üreyebilmektedir (95).

Tellüritin indirgenmesi: Mikobakterilerin çoğunluğu tarafından üretilen tellürit redüktaz enzimi renksiz potasyum tellüriti siyah renkli metalik tellüryuma indirgeyen enzimdir (95). Ancak farklı türlerin bu indirgeme reaksiyonunu gerçekleştirme hızı türden türe değişmektedir. MAK üyeleri, *M. celatum* ve hızlı üreyen mikobakterilerin çoğu sıvı besiyerinde tellüriti 3 gün içinde indirgeme özelliğine sahiptir. Bu test sıklıkla MAK türlerini tanımlamak için kullanılır (81).

Tween-80 hidrolizi: Deterjan özellikli bir madde olan tween-80 (polioksietilen sorbitan monooleat) bazı mikobakteriler tarafından üretilen lipazlar tarafından hidrolize edilerek oleik asit ve polioksietilen sorbitole dönüştürülür. Bu testte indikatör madde olarak bulunan nötral kırmızı tween-80 ile bağlı durumdayken kehribar rengindedir (95). Lipazlar tarafından tween-80 hidrolizi gerçekleştiğinde nötral kırmızı ile birbirinden ayrılırlar. Serbest kalan nötral kırmızı indikatörünün rengi pH:7 değerindeki normal değeri olan kırmızıya döner (81,95). *M. kansasii* türü 3-6 saatte bu test için pozitif reaksiyon verdiği için bu türün tanısında yararlı bir testtir. Kolonileri benzer özellikteki iki skotokromojen olan *M. gordonae* pozitif, *M. scrofulaceum* ise negatif sonuç vermektedir (27).

Üreaz testi: Mikobakterilerin üreyi hidroliz reaksiyonu ile parçalayarak amonyak ve karbondioksit oluşturması hem skotokromojenler, hem de fotokromojen olmayan mikobakteri türlerinin tanımlanmasında ayırt edici özellik olarak kullanılır. *M. scrofulaceum* üreaz pozitif, *M. avium* ve *M. intracellulare* ise üreaz negatiftir. Özellikle pigment oluşturan *M. avium* suşlarının tanımlanmasında yararlı bir testtir (95).

MacConkey agarda üreme: Hızlı üreyen mikobakteriler kristal viyole içermeyen MacConkey agarda üreme özelliğine sahiptir. Diğer mikobakteri türleri ise bu besiyerinde üreyemezler (27). Bu test 3 günlük arilsülfataz testi ile kombine olarak kullanılır (81).

Demir alımı: Hızlı üreyen mikobakteri türlerini birbirinden ayırmada yardımcı bir testtir. *M. fortuitum* ve *M. phlei* türleri besiyerinde çözünür halde bulunan demir tuzlarını alır ve %20'lik ferrik amonyum sitrat solüsyonu eklendiğinde kolonilerde paslı kahverengi bir görünüm oluşturur. *M. chelonae* ve *M. abscessus* türleri ise bu test için negatif reaksiyon vermektedir (27).



Tablo 5. Mikobakterilerin tanısında kullanılan fenotipik özellikler (81)

Tanımlayıcı terim	Organizma	Optimal Sıcaklık (°C)	Olğan koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Niasin	T2H ile üreme	Nitrat redüksiyonu	Semikantitatif katalaz (kabarcıkların mm'si)	68°C de katalaz	Tween hidrolizi	Tellürit redüksiyonu	%2 NaCl toleransı	Demir alımı	Arisulfataz 3 günlük	MacConkey agarca üreme	Üreaz	Prazinamidaz 4 günlük		
Yavaş üreyenler																			
<i>M. tuberculosis</i> kompleks	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i> <i>M. bovis</i> BCG	37R 37R 37Rt 37R	37R 37R 37Rt 37R	N N N N	+	V	-	<45	-	-	-/+	-	-	-	-	±	+		
Kromojen olmayanlar	<i>M. avium</i> kompleks <i>M. xenopi</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. simioidei</i> <i>M. goodii</i> <i>M. celatum</i> <i>M. indicus pranii</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. terrae</i> kompleks <i>M. indicus pranii</i> <i>M. goodii</i>	37St/R 42S 30R 37S 37R 37St 37S/St 30R 37SR 37R 30S/SR/R	37St/R 42S 30R 37S 37R 37St 37S/St 30R 37SR 37R 30S/SR/R	S N N N N N N N N N N	+	+	-	>45	±	-	±	-	-	-	-/+	-	-	V	
Kromojenler	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. goodii</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. indicus pranii</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. indicus pranii</i> <i>M. indicus pranii</i>	37SR/S 30S/SR 37S 37S 42S 37S 37S 37S 37S 37S	37SR/S 30S/SR 37S 37S 42S 37S 37S 37S 37S 37S	P P P P N/S S S S S/P S	-	+	-	>45	+	+	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-
Hızlı üreyenler	<i>M. fortuitum</i> grup <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. indicus pranii</i> <i>M. indicus pranii</i> <i>M. indicus pranii</i>	28R/S 28S/R 28S/R 28S 28S/R 28R 28S	28R/S 28S/R 28S/R 28S 28S/R 28R 28S	N N N N S S S	+	+	-	>45	±	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kromojenler	<i>M. neoaurum</i> <i>M. indicus pranii</i> <i>M. indicus pranii</i> <i>M. indicus pranii</i>	37S 37S 37S 37S	37S 37S 37S 37S	S S S S	-	+	+	>45	+	+	+	±	-	-	-	+	+	+	+

V: değişken, ±: genellikle mevcut, -/+ : genellikle mevcut değil, R: düzensiz, S: düzgün, SR: orta düzensiz, t: zayıf veya transparan, P: fotokromojen, S: skotokromojen, N: nonkromojen

2.7.2. Moleküler Testler

TDM tür tayini için geleneksel olarak kullanılan fenotipik testlerin sonuçlanması uzun sürmektedir. Ayrıca bu testler ile her zaman doğru ve kesin tanı koymak mümkün olmamaktadır. Mikobakteri türlerinin hızlı ve doğru tanımlanması için farklı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Polimeraz zincir tepkimesinin (PZT) mikrobiyologlar tarafından kullanılmaya başlamasıyla farklı ekosistemlerdeki mikroorganizmaları tanımlamak ve filogenetik çalışmalar yapmak için yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir (96). Dizi analizi, nükleik asit hibridizasyon yöntemleri, PZT-restriksiyon enzim analizi (PRA) ve DNA *microarray* TDM türlerinin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemlerdir (9,27).

2.7.2.1. DNA Dizi Analizi

Amplifiye edilmiş ürünün DNA dizi analizinin yapılması günümüzde sık kullanılan bir amplifikasyon sonrası moleküler yöntemdir. Yararlı bir yöntem olmasına rağmen hibridizasyon testlerine göre daha karmaşıktır. Dizileme, yazılım oluşturma ve kullanma, genetik veritabanı gibi konularda deneyime ihtiyaç duyulan bir yöntemdir. Genomda bulunan korunmuş bölgeler arasındaki değişken bölgelerin analizi mikroorganizmaların tanımlanması için güçlü bir alternatif oluşturmaktadır. Dizi analizi yöntemi bakteri, mikobakteri ve mantarların tanımlanmasında başarıyla kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalara ait ribozomal alt birimleri kodlayan genler, dizi analizi temelli tanımlamada en sık kullanılan hedef genlerdir (27). 16S rRNA, hsp65 ve rpoB gibi bazı genlerde bulunan özgül bölgelerin analizinin tür tanımlamada başarılı olduğu bildirilmiştir (20,97–99).

16S rRNA geni yaklaşık 1.500 baz çifti (bp) uzunluğundadır. Mikobakterilerin rutin tanısı için bu genin tamamının dizi analizinin yapılması pratik olmayan ve gereksiz iş yükü oluşturan bir uygulamadır. Bunun yerine bu genin 5' ucunda bulunan yaklaşık 500 bp uzunluğundaki bölgenin dizi analizinin yapılması çoğu mikobakteri türünün tanımlanması için yeterli olmaktadır (20). 16S rRNA geninin amplifikasyonu ve dizi analizi için özgül primer dizileri tasarlanmış ve onay almıştır. Kullanılan primerler bu gende bulunan çok değişken A ve B bölgelerini hedef almaktadır (100). Özellikle çok değişken A bölgesi mikobakteri türlerindeki çoğu türe özgü dizi varyasyonlarının görüldüğü bölgedir. Bazı yavaş üreyen TDM türlerinin çok değişken bölgeleri birbiriyle aynıdır, bu nedenle 16S rRNA dizi analizi bu türleri ayırmakta yeterli olmamaktadır. *M. marinum* ile *M. ulcerans*, *M. kansasii* ile *M. gastri* çok değişken bölgeleri birbiriyle aynı olan mikobakterilere örnektir. Bu türlerin

doğru tanımlanması için *internal transcribed spacer* (ITS), *hsp65* ve *rpoB* gibi başka gen bölgelerinin dizi analizi yapılmalıdır. Bunun yanında *M. gordonae*, *M. kansasii* ve *M. lentiflavum* gibi bazı türler sadece birkaç baz çiftindeki farklılık nedeniyle aralarında küçük farklılıklar bulunan tür içi 16S rRNA dizi varyantları oluşturmaktadır (20). Ticari dizi analizi sistemlerinden biri olan Microseq 500 16S rDNA (Life Technologies, Foster City, CA) sisteminin hızlı üreyen mikobakterilerden *M. chelonae* ve *M. abscessus* türlerini birbirinden ayırmada güçlük yaşadığı bildirilmiştir. Bu türleri ayırmada *hsp65* gen bölgesinin dizi analizinin 16S rRNA dizi analiziyle birlikte kullanılması önerilmiştir (101).

16S ve 23S rRNA genleri arasında bulunan ITS-1 gen bölgesi dizi analizi bir başka hedef bölgedir. Bu bölgeye ait dizinin uzunluğu 200-330 bp uzunluğundadır ve bu nedenle kolaylıkla analizi yapılabilir. ITS-1 gen bölgesinin yüksek değişkenlik gösterdiği ve bu nedenle tür tanımlamak için kullanılabilirliği bildirilmiştir. Ancak özellikle hızlı üreyen türlerde ve *M. simiae* ve *M. xenopi* gibi yavaş üreyen türlerde tür içi 2 veya daha fazla dizi varyantı gözlenmiştir (20). Ayrıca 16S rRNA dizi analizinde olduğu gibi *M. marinum* ve *M. ulcerans* türlerinin ITS-1 bölgesi dizileri de birbiriyle aynıdır. Bu nedenle bu türlerin birbirinden ayrılmasında uygun bir hedef bölge değildir (102).

65 kilodaltonluk (kDa) ısı şok proteinini kodlayan *hsp65* gen bölgesi yaklaşık 440 bp uzunluğundadır. 16S rRNA genine göre daha az korunmuş bir gen bölgesi olup tür içi ve türler arası polimorfizmler daha çok olduğu için birbirine yakın türleri tanımlama üstünlüğü bulunmaktadır. *M. marinum* ile *M. ulcerans*, *M. kansasii* ile *M. gastri*, bazı kısıtlılıklara rağmen *M. avium* subsp. *avium* ile *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. abscessus* ile *M. chelonae* türlerinin *hsp65* dizi analizi ile birbirinden ayırımı yapmak mümkündür. Yeni hızlı üreyen türlerle ilgili veritabanında çok az dizi yer alması ya da dizi bulunmaması, daha eski türlerin henüz detaylı olarak dizi analizininin yapılmamış olması bu gen bölgesinin dizi analizindeki kısıtlılıklardır. Bu bölgeyle ilgili kapsamlı bir veritabanına ihtiyaç duyulmaktadır (20).

RNA polimerazın beta alt birimi *rpoB* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gene ait 81 bp uzunluğundaki bölgede gerçekleşen mutasyon *M. tuberculosis* için rifampisin direncine neden olmaktadır. Bunun yanında TDM türlerinin tanımlanması için *rpoB* genindeki dizi farklılıklarının yararlı olabileceği belirtilmiştir (20,103). 16S rRNA ve *hsp65* dizi analizi ile tanımlanamayan türlerin *rpoB* dizi analizi ile tanımlanabildiği saptanmıştır (20). Bu gen bölgesinin kullanımını özellikle hızlı üreyen türlerin tanımlanmasını kolaylaştırmıştır (104).

Yeni türlerden olan *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M. phocaicum* ve *M. aubagnense* rpoB dizi analizi ile başarıyla tanımlanan türlerdir (104,105).

32 kDa ağırlığındaki protein geni, süperoksit dismutaz geni (*sodA*), *dnaJ*, *secA1* ve *recA* mikobakterilerin dizi analizi ya da PRA yöntemiyle tanısı için kullanılan diğer hedef bölgelerdir (20).

DNA dizi analizi TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanmasında altın standart yöntemdir (106,107). Ancak karmaşık olması ve yüksek maliyet gibi nedenlerden ötürü rutin klinik laboratuvarlarda kullanımı tercih edilmemektedir. Gerek duyulduğunda tanımlanacak izolatların bu konuda yeterli deneyimi olan referans laboratuvarlara gönderilmesi önerilmektedir (20).

2.7.2.2. PZT-Restriksiyon Analizi Yöntemi (PRA)

440 bp uzunluğunda hsp65 genine ait parçanın PZT ile amplifiye edilmesi, ardından ampikonların BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleriyle kesilmesi, daha sonra da elde edilen ürüne agaroz jel elektroforezi uygulanarak analiz edilmesine dayanan yöntemdir. Bu yöntem klinik açıdan önemi olan çoğu mikobakteri türü için özgün restriksiyon parça uzatma polimorfizmi (RFLP) paternlerinin açığa çıkmasını sağlayarak tür tanımlama olanağı sağlar (108). PRA yöntemi ucuz ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle uzun bir süre kullanılmıştır. Ancak parçalar arasındaki küçük boyut farkları bulunması, birbirine yakın mikobakteri türlerinin benzer ya da birbiriyle aynı restriksiyon paternlerine sahip olması gibi nedenler bu yöntemin teknik dezavantajları olmuştur. Ayrıca teknik deneyim gerektiren bir yöntemdir. Dizi analizi yöntemlerinin kullanımının artması ve maliyetinin düşmesiyle hsp65 geni için PRA yerine dizi analizi tercih edilmeye başlanmıştır (20).

2.7.2.3. Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri

TDM'leri tür düzeyinde tanımlamak için PZT sonrası ters hibridizasyon mantığıyla çalışan nükleik asit şerit yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemde ilk olarak araştırılan mikroorganizmaya ait nükleik asit dizisi biyotinlenmiş primerler kullanılarak PZT ile amplifiye edilmektedir. Amplifiye olan PZT ürünleri bir şerit membrana bağlı bulunan, türe özgü nükleik asit dizi parçaları içeren problara bağlanarak hibridize olur. Ardından gerçekleşen enzimatik bir reaksiyon ile renk değişimi olur. Türlerle özgü bant paternleri bulunmaktadır. Bu paternlerle elde edilen bant paterni karşılaştırılarak tür düzeyinde

tanımlama yapılmaktadır. Bu yöntemin avantajı çok sayıdaki türün varlığını tek bir çalışmada tespit edebilmesi, her tür için uygun bir prob seçimine gerek duyulmamasıdır (20).

Ters hibridizasyon tekniğiyle çalışan testlerden biri INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Ghent, Belçika) testidir. Mikobakteri DNA'sında bulunan 16S-23S arasındaki ITS gen bölgesini hedef alan bir testtir (20). MTK, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. chelonae* kompleks, *M. fortuitum-peregrinum* kompleks, *M. smegmatis* türleri bu test ile tanımlanabilmektedir (27). Bu testin kısıtlı yönlerinden biri *M. fortuitum* kompleks türleriyle *M. thermoresistibile*, *M. agri* ve *M. alvei* gibi klinik örneklerde nadir olarak rastlanan türler arasında bazen çapraz reaksiyon olmasıdır (109). Bunun yanında *M. chelonae* ve *M. abscessus* gibi birbirine yakın türleri ayırt etmekte zorlandığı bildirilmiştir (110).

GenoType Mycobacterium CM/AS testi (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) 23S rRNA gen bölgesini hedef alan bir ters hibridizasyon testidir (20,111). GenoType Mycobacterium iki farklı kitten oluşmaktadır. CM kiti sık rastlanan mikobakterileri içerirken, ek olarak kullanılan AS kiti ise daha nadir saptanan mikobakterileri içermektedir (20,112). CM kitiyle *M. avium* subspecies, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, MTK ve *M. xenopi* türleri saptanabilmektedir. GenoType AS kitiyle ise *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* ve *M. shimodei* gibi daha nadir rastlanan türler saptanmaktadır (113). Bu testin *M. abscessus* ve *M. lentiflavum* gibi bazı türleri tanımlamada sorun yaşadığı bildirilmiştir (112). Ayrıca kitin *M. intracellulare* probunun *M. arosiense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. mantonii* ve *M. saskatchewanense* gibi bazı yavaş üreyen mikobakterilerle çapraz hibridizasyon oluşturarak yanlış tanımlama yaptığı belirtilmiştir (20).

INNO-LiPA ve GenoType testlerinin her ikisi de katı ve sıvı kültürden tanımlama yapabilmektedir. Testlerin sonuç verme süresi yaklaşık 4-6 saattir. Speed-oligo Mycobacteria (Vircel, Granada, İspanya) testi ise yaklaşık 3 saatte sonuç vermektedir. Bu test hem 16S rRNA, hem de 16S-23S rRNA bölgelerini hedef olarak kullanır. MTK üyeleri ve 10 ek TDM türüyle birlikte 19 mikobakteri türünü tanımlamaktadır. Diğer iki nükleik asit hibridizasyon

testine göre daha az tür tanımlamakta ve çoğu türü kompleks ya da grup düzeyinde sonuç vermektedir (20). Nükleik asit hibridizasyon testleri dizi analizi gibi yöntemlere göre daha az teknik uzmanlık gerektiren, hızlı sonuç veren ancak yüksek maliyetli testlerdir (112).

2.7.2.4. DNA Microarray

“DNA microarray” genellikle bir cam yüzey üzerinde bilinen türlere ait çoklu DNA problemlerinin moleküler hibridizasyon amacıyla bulunduğu bir testtir. Bu yöntem kısa sürede binlerce genin eş zamanlı olarak analizini sağlayan, filogenetik analiz ve tür tanımlama için yararlı bir testtir. Türe özgü oligonükleotid problemleriyle gerçekleşen hibridizasyon reaksiyonu floresan salınımı ile tespit edilir (114). “DNA microarray” testinin tür tanımlama yanında rpoB direnç geni mutasyonunun tespitinde de yararlı olduğu bilinmektedir. “DNA microarray” testi şu an için araştırma amaçlı kullanılan, gelecek vadeden bir testtir. Testin dezavantajı maliyetinin yüksek olmasıdır (27).

2.7.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

İlk olarak 1906 yılında Mikhail Tswett tarafından bitki pigmentlerinin ayırımında kullanılan bu yöntem daha sonra biyokimyasal moleküllerin tanımlanması ve ölçümünde kullanılmıştır. Kromatografi yöntemi çeşitli maddelerin hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde farklı hızlarda hareket etmeleri mantığıyla çalışmaktadır. Hareketli olan çözücü madde incelenen karışımı sabit ortam boyunca taşır. Hareketli faz kromatografisi tekniğine göre gaz ya da sıvı olabilmektedir. Sabit faz ise sellüloz kağıt, kapiller cam gibi bir madde olabilir (115).

1970’li yılların sonlarında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi adında bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde cihazda bulunan pompalar aracılığıyla oluşturulan basınç metal bir sütun içinde bulunan sabit fazın içinden hareketli sıvı fazın geçişini sağlamaktadır. Bu durum araştırılan maddeyi oluşturan bileşenlerin hızlı bir şekilde fraksiyonlara ayrılmasıyla sonuçlanır. Farklı bileşenler farklı hızda ilerleyerek çıkışa farklı zamanlarda ulaşır. Bu bileşenler bir dedektör aracılığıyla tespit edilmektedir (116). Araştırılan maddenin özelliğine göre ultraviyole (UV), floresans, iletkenlik ve kütle gibi dedektörler seçilmektedir. Dedektörler aracılığıyla oluşan kromatogramlar kaydedilerek bilgisayar programlarıyla değerlendirilmektedir (115).

Mikobakteri türlerinin hücre duvarındaki mikolik asitlerin HPLC ile analizi önemli bir tanı aracı olmuştur. HPLC cihazlarının veritabanında bulunan kütüphaneler tıbbi olarak önemli ve sık karşılaşılan mikobakteri türlerine ait mikolik asit profillerini içermektedir. Araştırılan mikobakterinin mikolik asit analiziyle oluşan kromatogramlar kütüphanedekilerle karşılaştırılarak saatler içinde tür tanımlanmaktadır (116). HPLC kullanımı kolay, hızlı sonuçlanan ve özellikle yavaş üreyen TDM'lerin tanısında güvenilir bir yöntemdir. Ancak yöntemin birtakım kısıtlılıkları söz konusudur. Bazı yeni türlerin ve *M. simiae* kompleks üyelerinin tanımlanmasında zorluk yaşandığı belirtilmiştir (9). Bunun yanında *M. fortuitum* grup ve *M. smegmatis* grup üyelerinin bazı türlerinin ayırımında sorun yaşandığı, *M. chelonae* ve *M. abscessus* ayırımının bazen yapılamadığı bildirilmiştir (9,116). Geleneksel yöntemlere göre daha pahalı bir yöntem olması da yöntemin bir diğer dezavantajıdır (116). Tüm bu dezavantajları nedeniyle TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanmasında dizi analizi ve kütle spektrometresi gibi yöntemler HPLC ile mikolik asit analizinin yerini almaktadır (20).

2.7.4. Matris Destekli Lazer Dezorpsiyon/İyonizasyon-Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS)

Kütle spektrometresinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanıma girmesi patojenlerin tanımlanması açısından önemli bir gelişme olmuştur. Kütle spektrometre yöntemleri analiz edilen maddenin kütlesi (m) ve yükünün (z) ölçümüne dayanır. Kütle spektrometre cihazları başlıca 3 birimden oluşur. İlk birim olan iyon kaynağı analiz edilen maddenin iyonize olarak gaz fazına geçişini sağlar. İkinci birim olan kütle analizörü iyonları kütle/yük (m/z) oranına göre ayırarak uçuş zamanını hesaplar. Kütle analizörü iyonları birbirinden ayırmak için bir vakum odası ve statik veya dinamik bir elektrik/manyetik alan kullanılabilir. Üçüncü birim ise bir elektron çoğaltıcı veya hızlı osiloskop kullanarak iyonları saptar (20).

MALDI yöntemi örneğin matrisle eş zamanlı kristalizasyonu esasına dayanır. Burada kullanılan matris araştırılan mikroorganizmaya ait proteinlerin iyonizasyonunu uyarır. Kullanılan matrisle ilgili olarak özgül moleküler ağırlık aralıklarında protein spektrumları elde edilmektedir. Bu amaçla kullanılan alfa-4-siyano-4-hidroksisinnamik asit (HCCA) düzgün dağılım gösteren küçük küresel kristaller oluşumunu sağlar. HCCA daha az lazer atışı gerektirir ve her spektrum için 80-150 pik oluşturur. Bazı mikroorganizmalar için kullanımının uygun olmadığı belirtilmiştir. 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB), 5-kloro-2-

merkaptobenzotiazol ve 3,5-dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit MALDI için kullanılan diğer matriks türleridir (117).

Araştırılan koloniler ve üzerine konulan matriks, dalgaboyu matriksin absorpsiyon bandında bulunan lazer ışınının fotonları tarafından ışımaya uğrar. Işıma sonrasında moleküller iyonizasyona uğrayarak gaz fazına geçer (117). Oluşan iyonlar hızlandırılarak vakum uçuş tüpüne gönderilir. Burada iyonlar hızlarına göre ayrılır. İyonların hızı m/z oranına göre değişmektedir. Düşük m/z oranına sahip iyonlar yüksek m/z oranına sahip olanlara göre daha hızlı hareket eder (Şekil 3). Farklı aminoasit dizilerinden oluşan proteinler bir dizi peptit kütleleri oluşturur ve bunlar dedektör tarafından saptanır. Tanımlanan peptit kütlelerine ait spektrum belli bir mikroorganizma türüne ait bir proteine özgüdür. Peptit profilleri ya koloniden direkt iyonizasyon yoluyla ya da mikroorganizmadan ekstraksiyonla elde edilen protein ekstraktından elde edilir. Elde edilen spektrum bir yazılım aracılığıyla cihazın veritabanında bulunan spektrumlarla karşılaştırılarak tür tanımlama işlemi yapılır. Yanlış tanımlamaları engellemek için sonuçlar bir skorlama algoritması ile verilmektedir (117).

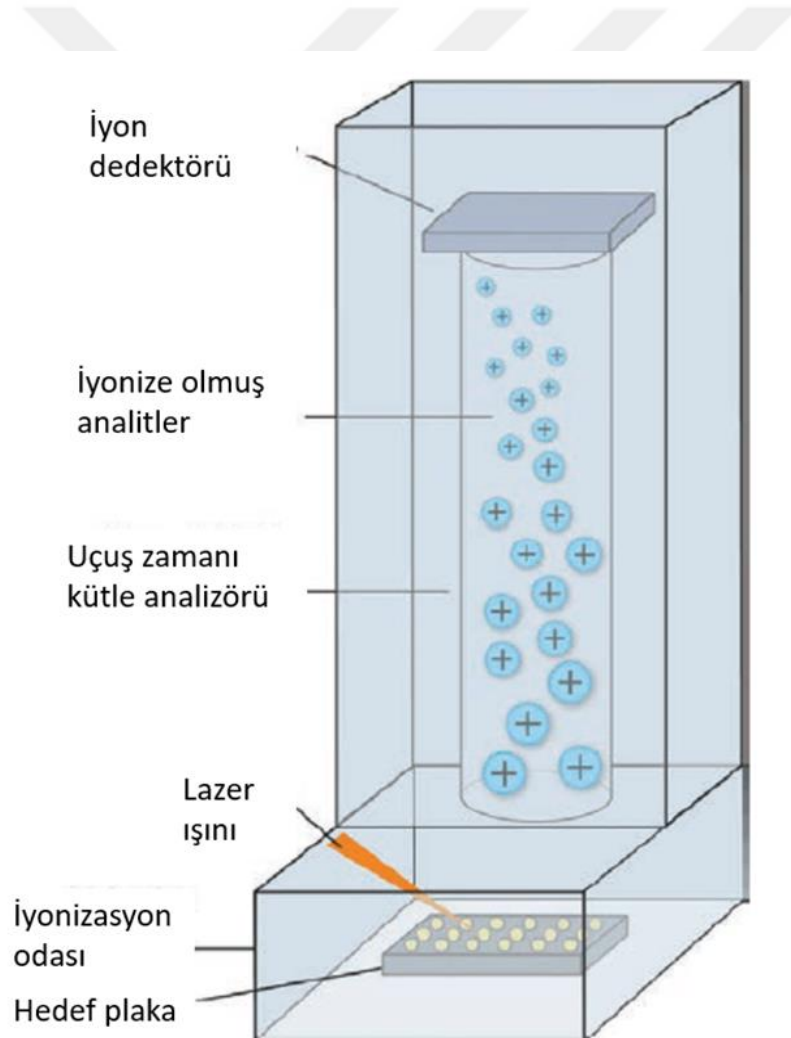
Bruker Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) ve bioMérieux Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) yaygın olarak kullanılan iki ticari MALDI-TOF MS sistemidir. Bu cihazlar temelde aynı prensibe dayanmakla birlikte kullandıkları veritabanları, tanı algoritmaları ve cihaz biçimi açısından farklılıklar gösterir (20).

Klinik laboratuvarlarda bakteri ve mayaların tanımlanmasında MALDI-TOF MS yönteminin güçlü bir tanı aracı olduğu bildirilmiştir (118,119). Yöntem oldukça basit, hızlı ve geleneksel tanı yöntemlerine göre düşük maliyetlidir. Cihazın ilk kurulumu ve birlikte kullanıldığı yazılım pahalı olsa da birim maliyeti oldukça düşük bir yöntemdir (120). Mikobakteri türlerinin hücre duvar yapısı MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmalarını zorlaştıran bir özelliktir. Bu nedenle bir ön işlem aşamasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu işlemin amacı kimyasal ve fiziksel yollarla hücre duvarına hasar vermek, formik asit ve asetonitril yardımıyla protein ekstraksiyonunu sağlamaktır (121). TDM'leri MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde tanımlamada kullanılan besiyerine göre yöntemin başarısında farklılıklar gözlemlendiği belirtilmiştir. Katı besiyerinden tanımlamanın güvenilir olduğu, sıvı besiyerinden tanımlamada sorunlar yaşandığı bildirilmiştir (121,122).

Mikobakterilerin MALDI-TOF MS ile tanımlanmasında karşılaşılan sorunlardan biri *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin kompleks düzeyinde tanımlanabilmesi, tür ayrımı

yapılamamasıdır. Ayrıca *M. abscessus* subsp. *massiliense* ve *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. mucogenicum* ve *M. phocaicum* gibi birbirine yakın bazı hızlı üreyen mikobakteri türlerini ayırt etmede zorlandığı bildirilmiştir (20).

Dizi analizi yönteminde olduğu gibi MALDI-TOF MS için de olmazsa olmaz ihtiyaçlardan biri kapsamlı bir veritabanıdır. Uygun kütüphane varlığı ile klinik açıdan önemi olan birçok mikobakteri türü başarıyla tanımlanabilir (20). MALDI-TOF MS için yapılan mikobakteri kütüphane güncellemeleri ile daha fazla tür doğru olarak tanımlanmaktadır. Ortaya çıkan yeni türlerin ve suşların doğru tanımlanması için de güncel kütüphane varlığı önem taşımaktadır (123).



Şekil 3. MALDI-TOF MS çalışma prensibi (20)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

2013-2019 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji Birimi'ne gönderilen balgam, bronş lavaj, BAL, trakeal sekret, lenf nodu ve doku biyopsi örneklerinden üretilen ve GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience/Almanya) kiti ile tür düzeyinde tanımlanarak stoklanan 85 TDM izolatu çalışmaya dahil edildi (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışmadaki TDM türlerinin yıllara ve örneklere göre dağılımı

TDM türü ve sayısı	Yıl	Örnek tipi					
		Balgam	Bronş lavaj	BAL	Trakeal sekret	Doku biyopsisi	Lenf nodu biyopsisi
<i>M. abscessus</i> (22)	2013	1	-	-	-	-	-
	2014	1	-	-	-	-	-
	2015	1	-	-	-	-	-
	2016	3	1	1	-	1	1
	2017	6	-	-	-	-	-
	2018	1	1	-	1	-	-
	2019	2	1	-	-	-	-
<i>M. chelonae</i> (4)	2016	-	2	1	-	-	-
	2018	1	-	-	-	-	-
<i>M. fortuitum</i> (37)	2013	-	28	2	-	-	-
	2014	-	2	-	-	-	-
	2015	-	1	-	-	-	1
	2016	1	-	-	-	-	-
	2019	2	-	-	-	-	-

Tablo 6 (Devam). Çalışmadaki TDM türlerinin yıllara ve örneklerle göre dağılımı

TDM türü ve sayısı	Yıl	Örnek tipi					
		Balgam	Bronş lavaj	BAL	Trakeal sekret	Doku biyopsisi	Lenf nodu biyopsisi
<i>M. gordonae</i> (5)	2014	1	-	-	-	-	-
	2018	1	-	-	-	-	-
	2019	2	1	-	-	-	-
<i>M. intracellulare</i> (9)	2016	1	1	-	-	-	-
	2018	1	-	-	-	-	-
	2019	2	3	1	-	-	-
<i>M. kansasii</i> (4)	2015	-	1	-	-	-	-
	2018	1	-	-	-	-	1
	2019	-	1	-	-	-	-
<i>M. lentiflavum</i> (1)	2019	1	-	-	-	-	-
<i>M. szulgai</i> (3)	2019	-	2	1	-	-	-

3.2. TDM'lerin Hibridizasyon Testi ile Tanımlanması

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon için LJ besiyerinde ya da BBL MGIT 7 ml tüplerinde üremiş mikobakteriler kullanıldı.

1. LJ besiyerinde üreyen mikobakterilerden ekstraksiyon yapılması

1.1. Eküvyon ile 1-2 koloni alındı ve vidalı kapaklı tüpe eklenen 100 µL lizis tamponu içinde süspansiyon edildi.

1.2. Önceden 95°C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika inkübe edildi.

1.3. Kapağı açmadan önce kısa süre santrifüj edildi.

1.4. 100 µL nötralizasyon tamponu (A-NB) eklendi ve vorteks yapıldı.

1.5. Maksimum 5 dakika hızda santrifüj edildi.

1.6. Süpernatant kısım ekstraksiyon ürünü olarak kullanılmak üzere temiz bir tüpe alındı.

2. BBL MGIT 7 ml tüplerinde üreyen mikobakterilerden ekstraksiyon yapılması

2.1. Sıvı kültürden 1 mL alınarak vidalı kapaklı tüpe aktarıldı.

2.2. 15 dakika 10.000 G'de santrifüj edildi ve süpernatant kısım atıldı.

2.3. Dipteki çökelti üzerine 100 µL Lysis Buffer (A-LYS) eklenerek süspanse edildi.

2.4. Önceden 95°C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika inkübe edildi.

2.5. Kapağı açmadan önce kısa süre santrifüj edildi.

2.6. 100 µL A-NB eklendi ve vorteks yapıldı.

2.7. Maksimum 5 dakika hızda santrifüj edildi.

2.8. Süpernatant kısım ekstraksiyon ürünü olarak kullanılmak üzere temiz bir tüpe aktarıldı.

3.2.2. PZT ile Amplifikasyon

1. Çalışılacak izolat sayısına (n) göre hesap edilerek PZT miksi hazırlandı.

- 35 µL Primer/Nucleotide miks (PNM) x n

- 5 µL 10x PZT buffer x n

- 2 µL magnezyum klorür [25 milimol (mM) MgCl₂] x n

- 3 µL su [H₂O (PZT grade)] x n

- 0.2 µL Taq Polimeraz x n

2. PZT miksi pipetlenerek karıştırıldıktan sonra örnek sayısı kadar tüpün her birine 45 µL pipetlendi.

3. Mikslerin üzerine 5 µL ekstrakt eklendi ve total volüm 50 µL'ye tamamlandı.

4. Tüpler ısı döngü cihazına yerleştirilerek önceden hazırlanan programda PZT döngüleri başlatıldı.

- 15 dakika 95 °C 1 döngü
- 30 saniye 95 °C } 10 döngü
- 2 dakika 58 °C }
- 25 saniye 95 °C } 20 döngü
- 40 saniye 53 °C }
- 40 saniye 70 °C }
- 8 dakika 70 °C 1 döngü

3.2.3. Hibridizasyon İçin Ön Hazırlık

1. Çalkalamalı ısıtıcı/ TwinCubator (Hain Lifescience, Almanya) önceden 45°C'ye ayarlandı.

2. Hibridizasyon tamponu (HYB) ve yıkama solüsyonu (STR) kullanılmadan önce 37-45 °C'ye getirildi.

3. Reaktifler kullanılmadan önce çalkalanarak içlerinde çökelti olmaması sağlandı.

4. Her hibridizasyondan önce konsantre konjugat (CON-C) reaktifi CON-D tamponu ile oda ısısında 1/100 oranında dilüe edildi. Bu amaçla her strip için 10 µL konsantre reaktife 990 µL tampon eklendi.

5. Konsantre substrat (SUB-C) reaktifi SUB-D tamponu ile oda ısısında 1/100 oranında dilüe edildi. Bu amaçla her strip için 10 µL konsantre reaktife 990 µL tampon eklendi.

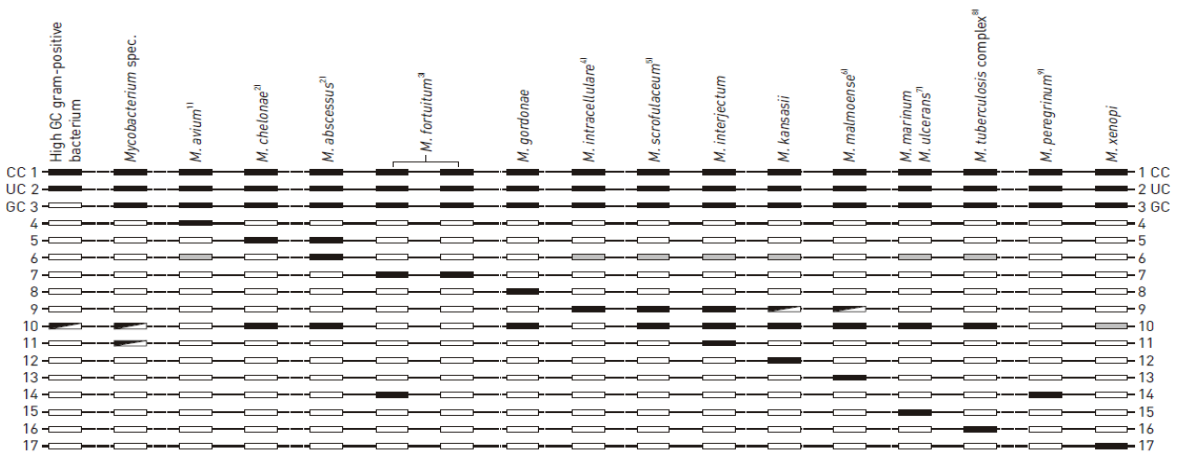
3.2.4. Hibridizasyon Reaksiyonu

1. Kanalın uç kısmına 20 µL denatürasyon solüsyonu (DEN) pipetlendi.

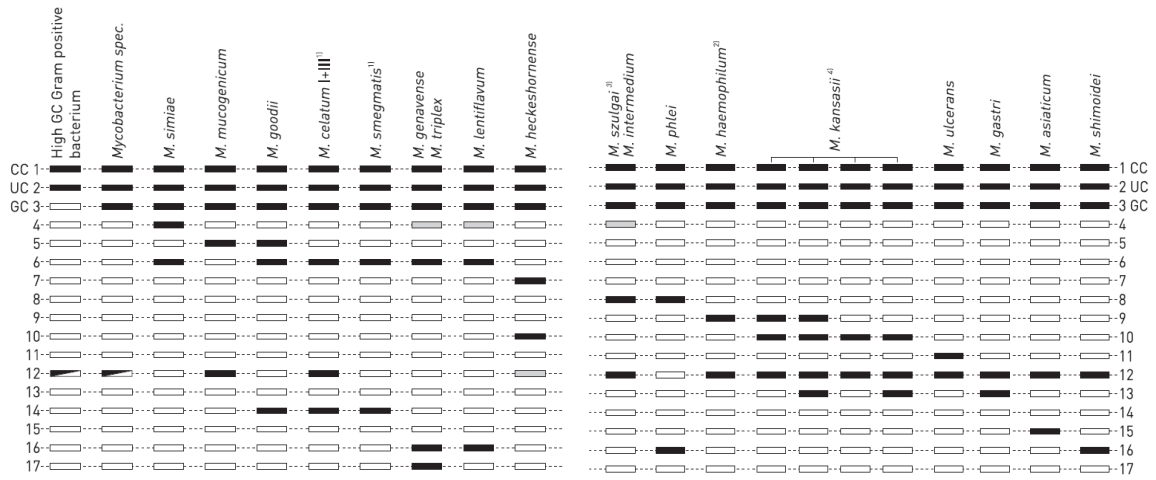
2. DEN solüsyonunun üzerine 20 µL PZT ürünü pipetlenerek pipetle karıştırıldı ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.

3. Karışımın üzerine 1 mL HYB eklendi ve homojen bir renk oluşana kadar tepsi yavaşça sallandı.

4. Her kanala renkli marker kısmı yukarıya gelecek şekilde bir strip yerleştirildi.
5. Çalkalamalı ısıtıcı/ TwinCubator’de 30 dakika, 45°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hibridizasyon tamponunun tamamı Pasteur pipeti ile aspire edildi.
6. 1 mL STR yıkama solüsyonu eklendi ve çalkalamalı ısıtıcı/ TwinCubator’de 45°C’de 15 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda yıkama solüsyonu aspire edildi.
7. Bundan sonraki aşamalar oda ısısında gerçekleştirildi. 1 mL Rinse solüsyonu (RIN) eklendi ve 1 dakika çalkalamalı platformda inkübe edildi. Daha sonra solüsyon aspire edildi.
8. 1 mL dilüe konjugat eklendi ve 30 dakika çalkalamalı platformda inkübe edildi. Konjugat aspire edildikten sonra her strip ikişer kez 1 dakika Rinse solüsyonu ile yıkandı ve solüsyon aspire edildi.
9. 1 mL distile su ile yıkama yapıldı ve su aspire edildi.
10. 1 mL dilüe substrat eklendi, ışısız ortamda ve oda ısısında stripler çalkalanmadan 3-20 dakika arası inkübe edildi.
11. Substrat aspire edilerek uzaklaştırıldı ve her strip 2 kez distile su ile yıkandı. Strip penset ile alınarak kurutma kağıdının arasına bırakılarak kuruması için beklendi.
12. Stripler GenoType Mycobacterium CM ve AS tanımlama kartları ile karşılaştırılarak değerlendirildi ve tür tanımlamaları yapıldı (Şekil 4 ve 5).



Şekil 4. GenoType Mycobacterium CM tanımlama kartı (124)



Şekil 5. GenoType Mycobacterium AS tanımlama kartı (125)

3.3. MALDI-TOF MS Yöntemi ile TDM'lerin Tanımlanması

3.3.1. TDM'lerin Üretilmesi

2013-2019 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda TDM olarak tanımlanan izolatlar ait LJ besiyerlerinden alınan koloniler 0,5 mL distile su içerisinde süspansiyon edilerek LJ besiyerine (Becton Dickinson, ABD) ekim yapıldı. LJ besiyeri bulunmayan ya da LJ besiyeri kontamine olan izolatların MGIT besiyerlerinden 0,5 mL alınarak LJ besiyerine ekim yapıldı. Tüm işlemler biyogüvenlik kabininde gerçekleştirildi. Ekim yapılan besiyerleri 37 °C'lik etüvde inkübe edilerek günlük olarak üreme takibi yapıldı. Üreyen koloniler Kinyoun boyama yöntemiyle boyanarak aside dirençli basil olduğu görüldü. Üreyen izolatlar işleme alındı (Şekil 6).



Şekil 6. LJ besiyerinde üreyen TDM kolonileri

3.3.2. MALDI-TOF MS Yöntemi İçin TDM'lerin İşlenmesi

Tüm TDM izolatları Bruker tarafından önerilen mikobakteri ekstraksiyon protokolüne (MycoEX) uygun olarak çalışıldı (126). Kolonilerle ilgili tüm işlemler biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. Organik çözücü ve matriks çeker ocak içerisinde hazırlandı.

3.3.2.1. Organik Çözücünün Hazırlanması

Gerekli kimyasallar:

- Asetonitril (ACN) (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Distile su (Polifarma, Tekirdağ, Türkiye)
- Trifloroasetik asit (TFA) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Yöntem:

1. 1,5 mL'lik vidalı kapaklı mikrosantrifüj tüpünün (Eppendorf, Hamburg, Almanya) içerisine 475 µL distile su eklendi.
2. Suyun üzerine 500 µL ACN eklendi.
3. Elde edilen karışımın üzerine 25 µL TFA eklendi.
4. Çözelti vorteks ile karıştırıldı.

3.3.2.2. Matriks Solüsyonunun Hazırlanması

1. Katı ve porsiyonlanmış halde bulunan HCCA matriks (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) üzerine hazırlanan organik çözücünden 250 µL eklendi.
2. Çözünme işlemi tamamlanana kadar vorteks yapıldı. Çözünmüş HCCA oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.3.2.3. TDM'lerin Protein Ekstraksiyon İşleminin Yapılması

1. 1,5 mL'lik vidalı kapaklı mikrosantrifüj tüpleri (Eppendorf, Hamburg, Almanya) içerisine 300 µL distile su eklendi.
2. Test edilecek TDM kolonileri plastik öze yardımıyla mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
3. Kapakları kapatılan tüpler sıcaklığı 95°C'ye ayarlanmış ısıtıcıya yerleştirildi. 30

dakika ısı bloğu uygulandı.

4. Isıtıcıdan çıkarılan tüplere oda sıcaklığına geldikten sonra 900 µL %95'lik etil alkol eklendi ve tüpler kapakları kapatılarak vorteks yapıldı.

5. Tüpler 13.000 rpm hızda 2 dakika santrifüj edildi, sonrasında tek kullanımlık pastör pipetleri ile tüplerin dibinde kolonilerin oluşturduğu çökeltiyeye zarar vermeden süpernatant uzaklaştırıldı.

6. Tüpler bir kez daha 13.000 rpm hızda ve 2 dakika santrifüj edildi. Kalan süpernatant kolonilere zarar vermeden uzaklaştırıldı.

7. Tüpler, kurumaları için oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

8. Kuruduktan sonra tüplere yaklaşık 40 mg zirkon boncuk eklendi.

9. Tüplere çökeltinin boyutuna göre 10-50 µL ACN eklendi. Kapakları kapatılarak 1 dakika vorteks yapıldı.

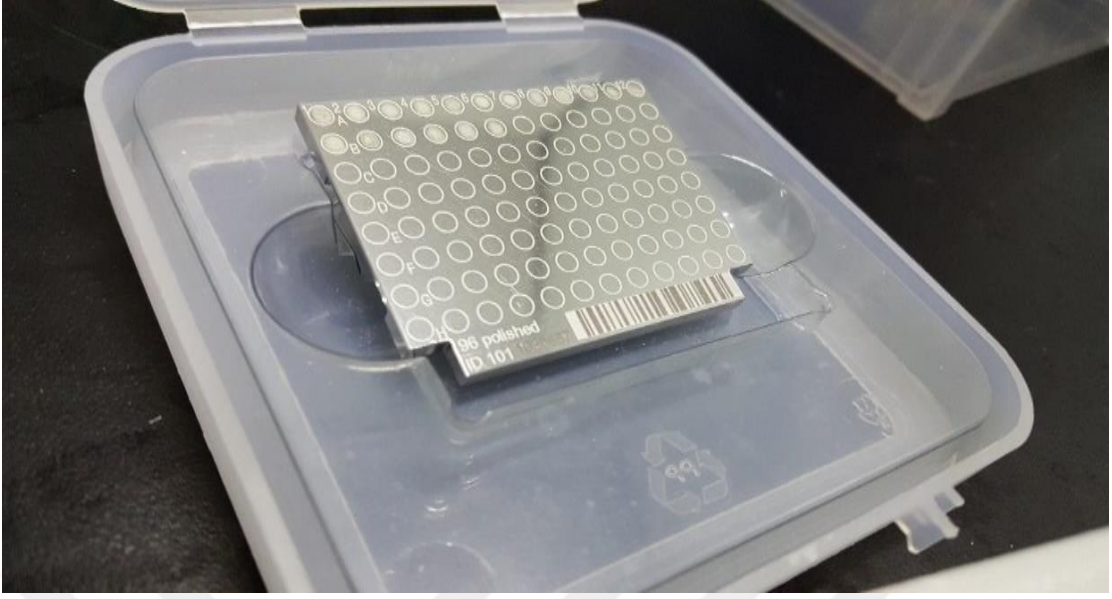
10. Tüplere 25 µL %70'lik formik asit (Merck, Darmstadt, Almanya) eklendi ve 5 saniye vorteks yapıldı.

11. Tüpler 13.000 rpm hızda 2 dakika süreyle santrifüj edildi.

12. Tüplerdeki süpernatant kısımlardan 1 µL alınarak MALDI hedef plakaya (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) aktarıldı ve kurumaya bırakıldı (Şekil 7).

13. Kuruma işlemi bittikten hemen sonra hedef plakadaki noktalara 1 µL HCCA matriks solüsyonu eklendi.

14. Cihaza yüklemeye hazır duruma gelmesi için hedef plaka üzerindeki matriks kuruyana kadar bekletildi.



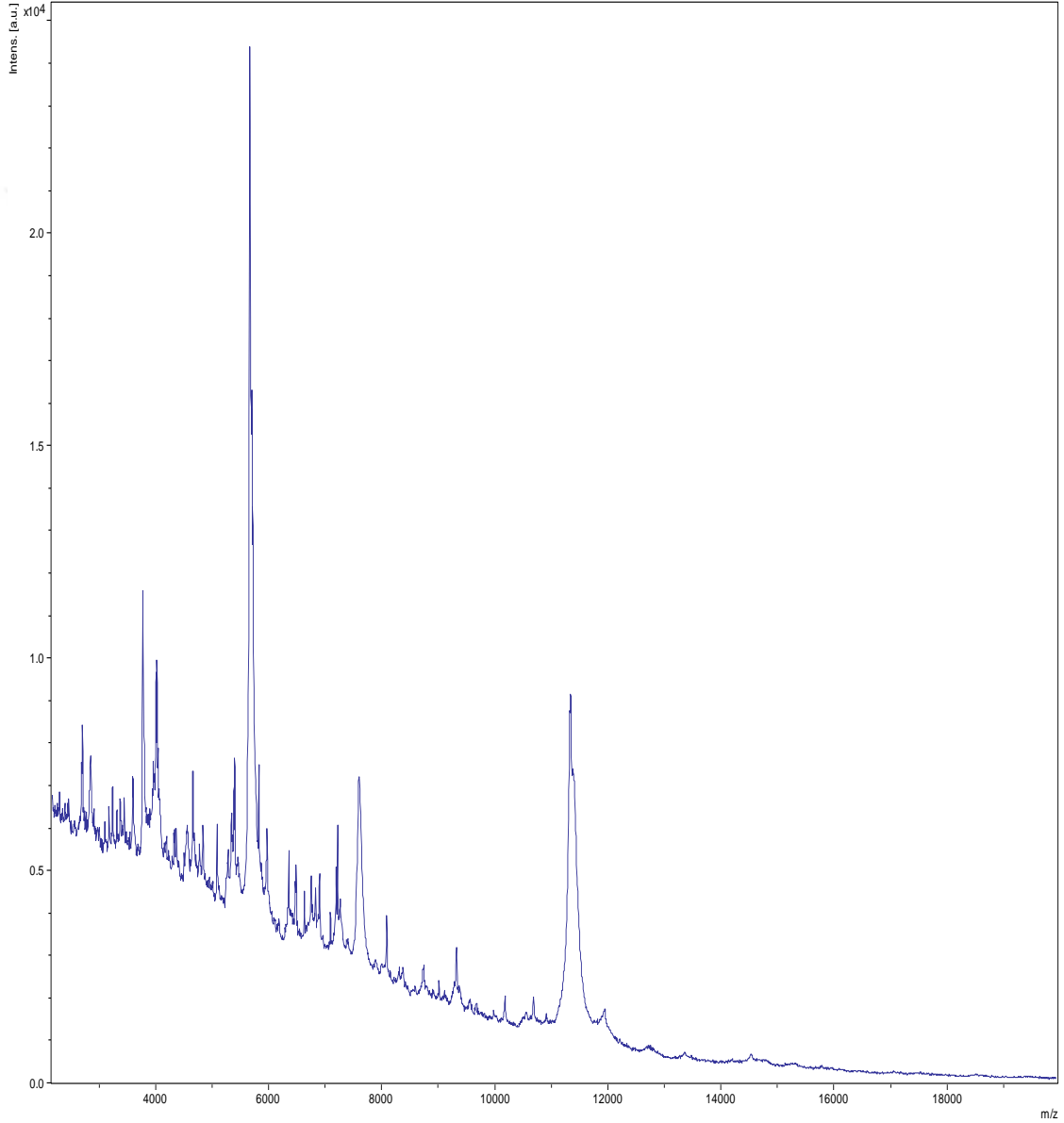
Şekil 7. Matriksi kuruyan MALDI hedef plakının görüntüsü

3.3.2.4. MALDI-TOF MS Cihazı ile Tanımlama İşlemi

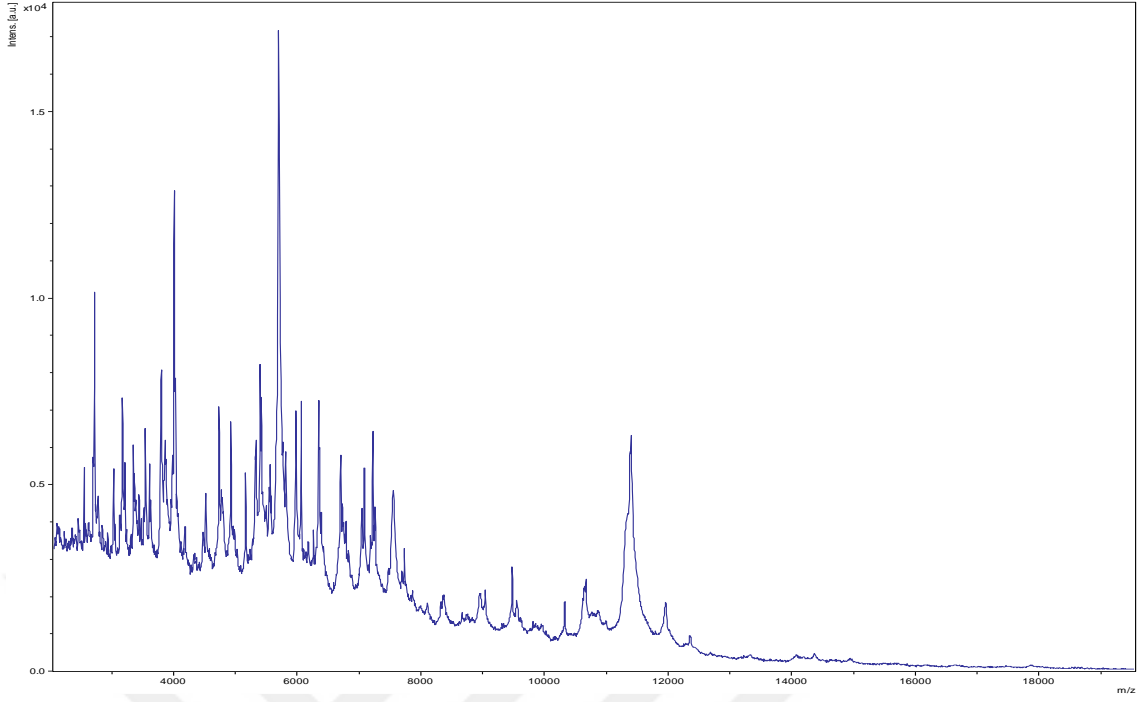
Hedef plaka MALDI Biotyper Smart (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) cihazına yüklendi. Cihaz 200 hertz (Hz) lazer frekans ve 2000-20000 Da kütle spektrum aralığında çalıştırılarak mikobakterilere ait kütle spektrumları elde edildi. FlexControl 3.4 yazılımı (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) ile protein profilleri elde edilerek FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) uygulaması aracılığıyla analizler yapıldı. Referans kütüphane olarak 178 mikobakteri türü içeren MBT Mycobacteria Library v6.0 kullanıldı (127).

4. BULGULAR

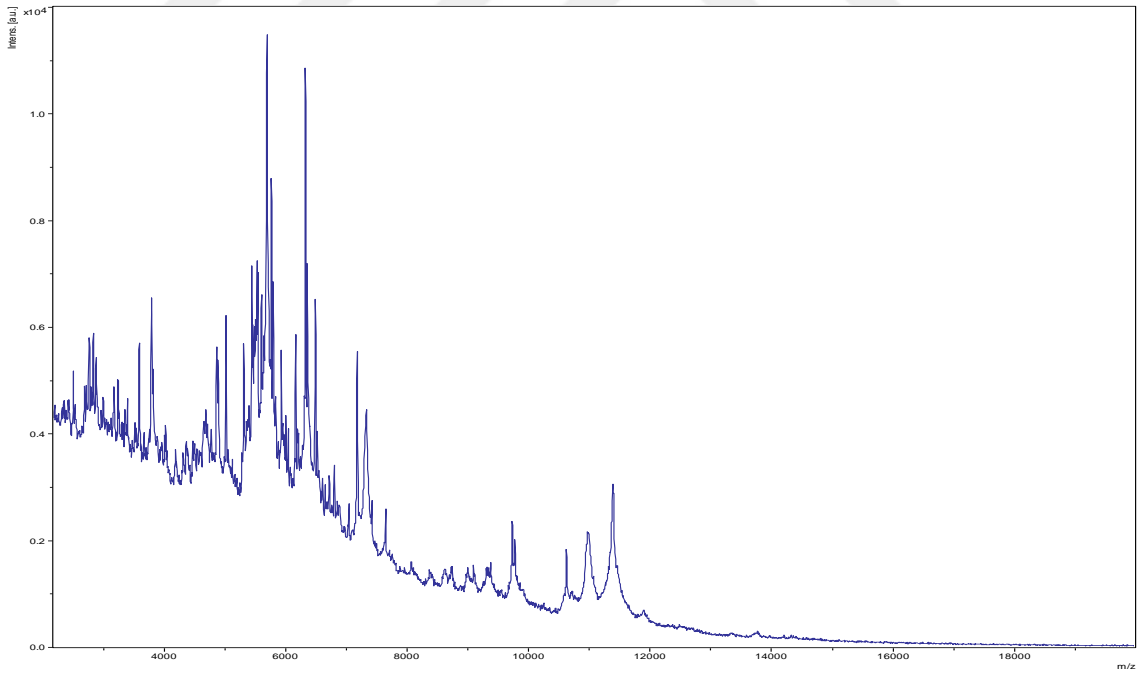
Çalışmada yer alan ve GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) kitiyle tür düzeyinde tanımlanmış olan 85 TDM izolatından 83'ü (%97.6) MALDI Biotyper Smart ile tür düzeyinde tanımlandı. 83 TDM izolatı için özgül kütle spektrumları elde edildi (Şekil 8, 9 ve 10). GenoType Mycobacterium CM/AS testi ile tanımlanan 2 izolat MALDI-TOF ile tür düzeyinde tanımlanamadı (Tablo 7).



Şekil 8. MALDI-TOF MS ile “*Mycobacterium chimaera-intracellulare* group” olarak tanımlanan bir izolata ait kütle spektrum grafiği



Şekil 9. MALDI-TOF MS ile *M. kansasii* olarak tanımlanan bir izolata ait kütle spektrum grafiği



Şekil 10. MALDI-TOF MS ile *M. lentiflavum* olarak tanımlanan bir izolata ait kütle spektrum grafiği

GenoType Mycobacterium CM/AS ve MALDI-TOF MS yöntemlerine ait tür tanımlama sonuçları Tablo 6'da yer almaktadır.

Tablo 7. GenoType Mycobacterium CM/AS ve MALDI-TOF MS sonuçları

İzolat Numarası	GenoType Mycobacterium CM/AS	Bruker MALDI-TOF MS	Bruker MALDI-TOF MS Skor	Uyum
1.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.41	Uyumlu
2.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.21	Uyumlu
3.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.20	Uyumlu
4.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.18	Uyumlu
5.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.08	Uyumlu
6.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.07	Uyumlu
7.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.07	Uyumlu
8.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.06	Uyumlu
9.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.05	Uyumlu
10.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.04	Uyumlu
11.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2.04	Uyumlu
12.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.92	Uyumlu
13.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.90	Uyumlu
14.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.88	Uyumlu
15.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.84	Uyumlu
16.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.83	Uyumlu
17.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.82	Uyumlu
18.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.82	Uyumlu
19.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.82	Uyumlu
20.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.80	Uyumlu
21.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.78	Uyumlu
22.	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1.74	Uyumlu
23.	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	2.13	Uyumlu
24.	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	1.95	Uyumlu
25.	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	1.71	Uyumlu
26.	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i>	2.00	Uyumsuz

Tablo 7 (Devam). GenoType Mycobacterium CM/AS ve MALDI-TOF MS sonuçları

27.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	2.14	Uyumlu
28.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	1.95	Uyumlu
29.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	1.91	Uyumlu
30.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	1.87	Uyumlu
31.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	1.85	Uyumlu
32.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	1.78	Uyumlu
33.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	1.75	Uyumlu
34.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.43	Uyumlu
35.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.40	Uyumlu
36.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.40	Uyumlu
37.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.38	Uyumlu
38.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.38	Uyumlu
39.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.38	Uyumlu
40.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.38	Uyumlu
41.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2,37	Uyumlu
42.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.37	Uyumlu
43.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.37	Uyumlu
44.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.36	Uyumlu
45.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.34	Uyumlu
46.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.34	Uyumlu
47.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.34	Uyumlu
48.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.33	Uyumlu
49.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.32	Uyumlu
50.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.31	Uyumlu
51.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.28	Uyumlu
52.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.26	Uyumlu
53.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.24	Uyumlu
54.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	2.16	Uyumlu
55.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	1.98	Uyumlu
56.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	1.92	Uyumlu

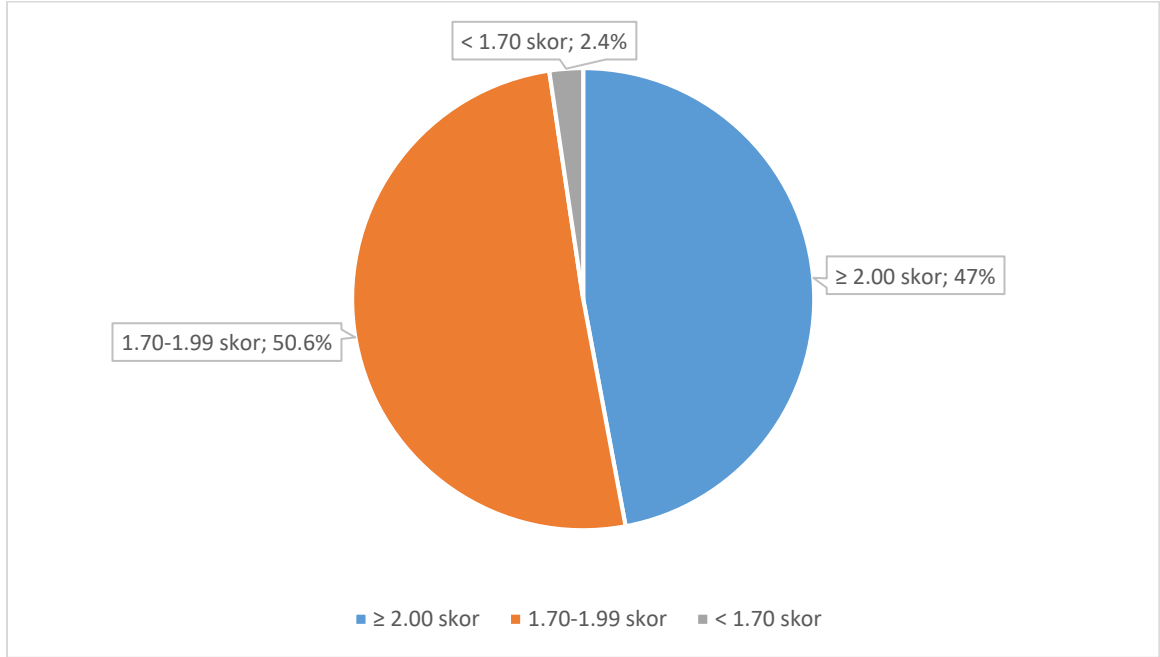
Tablo 7 (Devam). GenoType Mycobacterium CM/AS ve MALDI-TOF MS sonuçları

57.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	1.90	Uyumlu
58.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	1.90	Uyumlu
59.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	1.90	Uyumlu
60.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	1.88	Uyumlu
61.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	1.85	Uyumlu
62.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	1.81	Uyumlu
63.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	1.78	Uyumlu
64.	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	2.03	Uyumlu
65.	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	1.99	Uyumlu
66.	<i>M. gordonae</i>	<i>M. paragordonae</i>	2.26	Uyumlu
67.	<i>M. gordonae</i>	<i>M. paragordonae</i>	1.95	Uyumlu
68.	<i>M. gordonae</i>	<i>M. paragordonae</i>	1.88	Uyumlu
69.	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i> <i>intracellulare group</i>	2.12	Uyumlu
70.	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i> <i>intracellulare group</i>	1.97	Uyumlu
71.	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i> <i>intracellulare group</i>	1.97	Uyumlu
72.	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i> <i>intracellulare group</i>	1.91	Uyumlu
73.	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i> <i>intracellulare group</i>	1.86	Uyumlu
74.	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i> <i>intracellulare group</i>	1.83	Uyumlu
75.	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i> <i>intracellulare group</i>	1.81	Uyumlu
76.	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. colombiense</i>	1.82	Uyumlu
77.	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. colombiense</i>	1.70	Uyumlu
78.	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	2.14	Uyumlu
79.	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	2.07	Uyumlu

Tablo 7 (Devam). GenoType Mycobacterium CM/AS ve MALDI-TOF MS sonuçları

80.	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	1.94	Uyumlu
81.	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	1.88	Uyumlu
82.	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	1.85	Uyumlu
83.	<i>M. szulgai</i>	<i>M. lentiflavum</i>	1.95	Uyumsuz
84.	<i>M. szulgai</i>	Tanımlanamadı	-	Uyumsuz
85.	<i>M. szulgai</i>	Tanımlanamadı	-	Uyumsuz

Bruker MALDI-TOF MS ile yapılan bakteriyoloji çalışmalarında tür düzeyinde tanımlama için ≥ 2.00 , cins düzeyinde tanımlama için 1.70-1.99 arası güvenilir tanımlama skoru olarak belirlenmiştir. 1.70'in altındaki skorlar ise güvenilir olmayan tanımlama anlamına gelmektedir. Ancak mikobakteriler için yapılan çalışmalarda sonuçların moleküler yöntemlerle uyum göstermesi nedeniyle tür düzeyinde güvenilir tanımlama için ≥ 1.70 skor yeterli kabul edilmektedir (12,122). Bizim çalışmamızda da ≥ 1.70 skor tür düzeyinde tanımlama için yeterli olarak kabul edildi. Çalıştığımız izolatların 40 (%47) tanesi ≥ 2.00 , 43 (%51) tanesi 1.70-1.99 arası skor ile tanımlanırken 2 (%2) izolat için <1.70 skor elde edilmiş ve tanımlanamamıştır (Şekil 11).



Şekil 11. MALDI-TOF MS ile tanımlanan izolatlar için skor dağılımı

Çalışmada yer alan izolatlardan 22 *M. abscessus*, 4 *M. kansasii* ve 1 *M. lentiflavum* izolatının tamamı GenoType Mycobacterium CM/AS testi ile uyumlu olarak tanımlandı. Dört *M. chelonae* izolatının üçü (%75) *M. chelonae* olarak tanımlanırken bir izolat (%25) *M. abscessus* olarak tanımlandı. Otuz yedi *M. fortuitum* izolatından 30 (%81) izolat *M. porcinum*, 7 (%19) izolat *M. fortuitum* olarak tanımlandı. Genotype Mycobacterium CM/AS testinde *M. porcinum* ayrı bir tür olarak yer almadığı ve *M. fortuitum* kompleks içinde yer alan bir tür olduğu için GenoType Mycobacterium testiyle MALDI-TOF sonuçları bu türlere ait 37 izolat için uyumlu kabul edildi. Çalışmada bulunan 5 *M. gordonae* izolatının 2'si (%40) *M. gordonae*, 3 izolat (%60) ise *M. paragordonae* olarak tanımlandı. *M. paragordonae* türü de GenoType Mycobacterium testiyle tanımlanabilen türler arasında yer almayan bir tür olup, genetik açıdan *M. gordonae* türü ile çok yüksek benzerlik gösterdiği için bu izolatların sonucu da uyumlu kabul edildi (128). Dokuz *M. intracellulare* izolatının yedisi (%78) *M. chimaera-intracellulare* group, ikisi (%22) *M. colombiense* olarak tanımlandı. *M. chimaera* ve *M. intracellulare* MAK içinde yer alan iki türdür. Protein spektrumları birbiriyle çok benzer olduğu için MALDI-TOF MS yöntemiyle bir grup olarak tanımlanmaktadır. *M. colombiense* de yine MAK içinde yer alan türlerden biridir. *M. chimaera* ve *M. colombiense* GenoType Mycobacterium testiyle ayrı bir tür olarak tanımlanamamaktadır. Bunun yanında GenoType Mycobacterium testinde *M. chimaera* ve *M. intracellulare* türlerinin aynı bant paternini gösterdiği belirtilmiştir (124). Bu nedenle bu dokuz izolatın sonucu da iki test için uyumlu kabul edildi. Üç *M. szulgai* izolatından bir izolat *M. lentiflavum* olarak tanımlanırken, iki izolat ise MALDI-TOF MS ile tanımlanamadı. İki test arasındaki uyum 81/85 (%95.2) olarak hesaplandı. Bunun yanında her iki test için hasta başı maliyet ve test süresi değerleri hesaplanarak karşılaştırıldı (Tablo 7).

Tablo 8. GenoType Mycobacterium CM/AS ve Bruker MALDI-TOF MS testleri için birim maliyet değerleri ve test süreleri

	GenoType Mycobacterium CM/AS	Bruker MALDI-TOF MS
Hasta başı maliyet	25 \$	1 \$
Test süresi	5 saat	1 saat 30 dakika

5. TARTIŞMA

TDM'lere bağlı enfeksiyonların insidansı dünya genelinde artmaktadır. Hem immün sistemi baskılanmış kişilerde, hem de immün sistemi sağlam kişilerde hastalığa neden olmaktadır. Nadiren insandan insana bulaş görölse de genellikle su ve toprak gibi çevresel kaynaklardan insana bulaşmaktadır. TDM türleri antibiyotiklere direnç kazanmaları nedeniyle tedavisi zor enfeksiyonlara yol açmaktadır. En sık solunum yolu enfeksiyonu şeklinde klinik oluşturan TDM'ler lenfadenopatiden aseptik menenjitte kadar değişen enfeksiyonlar oluşturabilmektedir. Doğru antimikrobiyal tedavinin verilmesi için de mikobakteriler için tür düzeyinde tanımlama yapılması önem taşımaktadır.

Laboratuvarında TDM'leri tanımlamak için kullanılan biyokimyasal yöntemler hem uygulaması ve değerlendirmesi zor, hem uzun sürede sonuçlanan yöntemler olması nedeniyle daha hızlı, duyarlı ve güvenilir tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur. DNA dizi analizi ve nükleik asit hibridizasyon yöntemi gibi moleküler yöntemler, HPLC ile mikolik asit analizi, MALDI-TOF MS gibi kütle spektrum analizi yapan yöntemler bu amaçla kullanılan yöntemlerdir (129). Bu yöntemlerden HPLC eğitimli personele ihtiyaç duyulan ve pahalı bir yöntemdir (130). Nükleik asit hibridizasyon testleri PZT ve sonrasında elde edilen ürünlerin membrana bağlı problemlarla hibridizasyonuna dayanan testlerdir. Ancak oldukça pahalı ve zaman alıcı testlerdir. Ayrıca maliyet etkin çalışmak için izolatların biriktirilerek tanımlanması gerekmekte ve bu da zaman kaybına neden olmaktadır (131). Hızlı ve özgül tanımlama imkanı sunan DNA dizi analizi mikobakteri tanımlamada altın standart yöntem olsa da pahalı ve moleküler mikrobiyoloji açısından kalifiye personel gerektiren bir yöntemdir (13).

MALDI-TOF MS, uygulaması basit, hızlı ve maliyet etkin bir yöntem olarak bilinmektedir (12). Klinik örneklerden bakteri ve mantar türlerinin rutin olarak tanımlanması, epidemiyolojik çalışmalar, su ve gıda kaynaklı patojenlerin saptanması, antimikrobiyal direnç tespiti gibi amaçlarla mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaktadır (132). MALDI-TOF MS yöntemiyle mikobakterilerin tanımlanması ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (12–14,120,121).

Bu çalışmada Bruker MALDI-TOF MS ile GenoType Mycobacterium CM/AS testi karşılaştırıldı. Laboratuvarımızda rutin olarak TDM tür tayininde kullanılmış olan GenoType Mycobacterium CM/AS ile tanımlanan 85 TDM izolatı MALDI-TOF MS ile çalışılarak iki

testin uyumu, birbirlerine olan üstünlükleri belirlendi ve iki testin süreleri ve birim maliyetleri karşılaştırıldı, MALDI-TOF MS yönteminin mikobakterilerin rutin tanısına uygun olup olmadığı değerlendirildi.

Çalışmamıza dahil olan 85 izolatın 83'ü (%97.6) MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde tanımlandı. İki testin uyumu % 95.2 (81/85) olarak hesaplandı. 2 izolat (%2.35) tür düzeyinde tanımlanamadı, 2 izolat (%2.35) için ise iki testte tanımlanan türler birbiriyle uyumsuz bulundu. Bu nedenle toplam 4 izolat (%4.8) için sonuçlar uyumsuz olarak değerlendirildi.

Literatürdeki çalışmalarda bu iki test arasındaki uyum genel olarak bizim çalışmamızdakiyle benzer düzeydedir. Mediavilla-Gradolph ve ark. İspanya'da yaptıkları çalışmada 66 TDM izolatını GenoType Mycobacterium CM/AS ve Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) ile tanımlayarak iki testin sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada MALDI-TOF MS için Mycobacteria Library v1.0 kütüphanesi kullanılmıştır. GenoType testi izolatların 64'ünü (%96.9), MALDI-TOF MS ise 65'ini (%98.4) tanımlamıştır. İki test arasındaki uyum % 96.9 olarak hesaplanmıştır. İki testten en az biriyle tanımlanamayan izolatlar referans laboratuvara gönderilmiştir. Bu izolatlar referans laboratuvarında PRA ve 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanmıştır. Bir *M. elephantis* izolatı sadece MALDI-TOF MS ile tanımlanmış, dizi analiziyle de sonuç doğrulanmıştır. İki yöntem tarafından da tanımlanamayan bir izolat ise dizi analiziyle *M. duvalii* olarak tanımlanmıştır. Bu türün çalışmada kullanılan Mycobacteria Library v1.0 kütüphanesinde yer almayan bir tür olduğu belirtilmiştir (133).

İspanya'da yapılan bir diğer çalışmada Costa-Aldalde ve ark. tarafından hızlı üreyen TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanması açısından GenoType Mycobacterium CM/AS ve Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS yöntemleri karşılaştırılmıştır. Referans yöntem olarak rpoB geninin parsiyel dizi analizi kullanılmıştır. Bu yöntemin doğruluğunu artırmak amacıyla filogenetik analiz de gerçekleştirilmiştir. Dizi analiziyle tanımlanan 43 türün GenoType ile 27'si (%62.8), MALDI-TOF MS ile 38'i (%88.3) uyumlu olarak sonuçlanmıştır. GenoType ile doğru tanımlanan 27 izolat MALDI-TOF MS ile de doğru tanımlanırken, MALDI-TOF MS ek olarak 11 izolatı daha doğru tanımlamıştır. Bu çalışmada MALDI-TOF MS yönteminin tür tanımlamada GenoType yöntemine göre belirgin olarak daha başarılı olduğu belirtilmiştir (134).

Akyar ve ark. tarafından yapılan ve dört merkezden alınan izolatları içeren çalışmada hsp65/16S rRNA dizi analizi yöntemi ile Bruker MALDI-TOF MS karşılaştırılmıştır. MBT ML 4.0 kütüphanesinin kullanıldığı, 60 MTK ve 95 TDM izolatının yer aldığı çalışmada Bruker MALDI-TOF MS MTK izolatlarının % 100'ünü, TDM izolatlarının % 91'ini tür düzeyinde tanımlamıştır. Tanımlanan TDM izolatları için iki test arasındaki uyum % 95 olarak hesaplanmıştır (12).

Şamlı ve ark. tarafından Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde yapılan çalışmada 2012-2013 arasında klinik örneklerden üremiş 69 izolat MPT64 immünokromatografik test ile 56 (%81) MTK ve 13 (%19) TDM izolatı şeklinde ayrılmıştır. Daha sonra izolatlar GenoType Mycobacterium CM/AS ve Vitek MS (bioMérieux, Fransa) ile tanımlanmıştır. İzolatların % 100'ü GenoType testiyle tür düzeyinde tanımlanmıştır. Vitek MS ile MTK izolatlarının % 100'ü doğru tanımlanırken, TDM izolatları için bu oran % 38.5'tir. Çalışmada yer alan 5 *M. intracellulare* izolatının tamamı GenoType hibridizasyon testi ile uyumlu sonuç vermiştir. Diğer 8 (%61.5) izolat ise tür düzeyinde tanımlanamamıştır. Bu çalışmada TDM'lerin büyük kısmının MALDI-TOF ile tanımlanamaması, kullanılan VITEK MS V2.0 kütüphanesinin eksikliği ile ilişkilendirilmiştir (14).

Genç ve ark. tarafından yapılan çalışmada 152 TDM izolatı Bruker MALDI-TOF MS ve PRA ile çalışılmıştır. Altın standart yöntem olarak hsp65 dizi analizi kullanılmıştır. MALDI-TOF MS izolatların %97.4'ünü, PRA yöntemi izolatların %98'ini doğru tanımlamıştır. MALDI-TOF MS ile PRA arasındaki uyum %93.4 olarak hesaplanmıştır (135).

Bizim çalışmamızda yer alan türlerden *M. abscessus*, *M. kansasii* ve *M. lentiflavum* için iki test arasındaki uyum %100 olarak hesaplandı. Sriram ve ark. tarafından yapılmış çalışmada fenotipik yöntemlerle tanımlanmış 35 *M. abscessus* izolatı Bruker MALDI-TOF MS ile çalışılmıştır. Mycobacterium v2.0 kütüphanesinin kullanıldığı bu çalışmada izolatların %65.7'si (23/35) 1.70 ve üzeri skorla tür düzeyinde tanımlanmıştır (136). Akyar ve ark. tarafından yapılan çalışmada hsp65/16S rRNA dizi analizi ile tanımlanan 11 *M. abscessus* izolatının 10'u (%91), 8 *M. kansasii* ve 4 *M. lentiflavum* izolatının tamamı (%100), Bruker MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde başarıyla tanımlanmıştır (12). Mediavilla-Gradolph ve ark. tarafından yapılan çalışmada 4 *M. abscessus*, 4 *M. kansasii* ve 3 *M. lentiflavum* izolatı için Bruker MALDI-TOF MS ve GenoType Mycobacterium CM/AS arasındaki uyum her 3 tür için de % 100 olarak hesaplanmıştır (133).

Çalışmamızdaki *M. chelonae* izolatları için iki test arasındaki uyum % 75 olarak hesaplandı. GenoType Mycobacterium CM/AS ile *M. chelonae* olarak tanımlanan 1 izolat MALDI-TOF MS ile 2.00 skorla *M. abscessus* olarak tanımlandı. Mediavilla-Gradolph ve ark. çalıştıkları 5 *M. chelonae* izolatı için Bruker MALDI-TOF MS ve GenoType Mycobacterium CM/AS testlerinin uyum değerini %100 olarak hesaplamıştır (133). *M. abscessus* ve *M. chelonae* filogenetik olarak birbirine yakın türlerdir. Bunlardan *M. abscessus* türünün etken olduğu enfeksiyonların tedavisinin *M. chelonae* türünün etken olduğu enfeksiyonlara göre tedavisinin daha zor olduğu bildirilmiştir (9). TDM'lerin tedavisinde önemli bir yer tutan makrolid grubu antibiyotiklere *erm* geni nedeniyle indüklenebilir direnç gelişebilmektedir. *M. abscessus* türüne ait suşların büyük kısmında *erm* (41) geninin eksprese olduğu bilinirken *M. chelonae* türlerinde *erm* geninin eksprese olmadığı, *M. chelonae* türünün makrolidlere daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (137). Bu iki türün ayırımının doğru yapılması tedaviyi yönlendirmede önemli bir basamak oluşturmaktadır. MALDI-TOF MS, çalışmamızdaki bu izolat için güvenilir olarak kabul edilen bir skorla *M. abscessus* olarak tanımlama yapmıştır. Ayrıca nükleik asit hibridizasyon testlerinin zaman zaman *M. chelonae* ve *M. abscessus* türlerini birbirinden ayırmada zorluk çektiği bildirilmiştir (112). Kesin bir sonuca varmak için iki testin uyumsuz sonuç verdiği bu izolatın dizi analizi gibi üçüncü bir testle tanımlanması doğru sonucu elde etmeye yardımcı olabilir.

Çalışmamızda yer alan ve GenoType ile *M. fortuitum* olarak tanımlanan 37 izolattan 30'u (%81) MALDI-TOF MS ile *M. porcinum* olarak tanımlandı. *M. porcinum*, *M. fortuitum* kompleks içinde yer almaktadır. *M. fortuitum* kompleks *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. septicum*, *M. conceptionense*, *M. boenickei*, *M. houstonense*, *M. neworleansense*, *M. brisbanense*, *M. farcinogenes*, *M. senegalense* ve *M. setense* türlerini içermektedir (138). Bunlardan *M. porcinum* ilk kez 1983 yılında Tsukamura ve ark. tarafından domuzlarda submandibuler lenfadenit etkeni olarak tanımlanmıştır. Tsukamura ve ark. bu türün *M. fortuitum* ile oldukça benzer bir tür olduğunu ifade etmişlerdir. *M. porcinum* türünün D-mannitol, i-myo-inozitol ve süksinamidaz pozitif, nitrat negatif olması; ayrıca amonyak nitrojeni varlığında benzoatı tek karbon kaynağı olarak kullanması gibi özellikler yönünden *M. fortuitum* ile farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir (139). *M. fortuitum* solunum yolu enfeksiyonları, kemikle ilgili enfeksiyonlar, cerrahi sonrası deri/yumuşak doku enfeksiyonları ve kateter ilişkili enfeksiyonlardan sorumlu tutulmuştur (140). *M. porcinum* türünün de benzer şekilde başta yara yeri enfeksiyonları olmak üzere solunum yolu enfeksiyonları,

santral venöz kateter ilişkili enfeksiyonlar, lenfadenit, osteomyelit, peritonit gibi enfeksiyonlardan sorumlu olduğu belirtilmiştir (141).

Mediavilla-Gradolph ve ark. tarafından yapılan çalışmada GenoType Mycobacterium CM/AS ile *M. fortuitum* olarak tanımlanan 7 izolat Bruker MALDI-TOF MS ile çalışıldığında 6'sı (%86) *M. fortuitum*, 1'i (%14) ise *M. porcinum* olarak tanımlanmıştır. Mediavilla-Gradolph ve ark. *M. porcinum* olarak tanımlanan bu izolatın sonucunu iki test için uyumlu kabul ettiklerini ifade etmişlerdir (133).

M. porcinum GenoType Mycobacterium CM/AS ile tanımlanamayan türlerden biridir (124). MALDI-TOF MS ile *M. porcinum* olarak tanımlanan 30 izolatın GenoType Mycobacterium CM/AS testiyle *M. fortuitum* olarak tanımlanması bu iki tür arasındaki filogenetik yakınlıktan kaynaklanmaktadır. Bu gerekçeyle çalışmamızdaki bu izolatların sonuçları uyumlu olarak kabul edildi. Ayrıca birbirine oldukça benzer bu iki türün ayrımını yapabilmesi MALDI-TOF MS yönteminin nükleik asit hibridizasyon yöntemine bir üstünlüğü olarak düşünülebilir.

GenoType Mycobacterium CM/AS ile *M. gordonae* olarak tanımlanan 5 izolatın 2'si (%40) MALDI-TOF MS ile de aynı sonucu verirken, diğer 3 (%60) izolat ise *M. paragordoniae* olarak tanımlandı. *M. paragordoniae* 2014 yılında Kim ve ark. tarafından yeni bir mikobakteri türü olarak tanımlanmıştır. İlk kez Güney Kore'de akciğer enfeksiyonu kliniği olan bir hastanın balgam örneğinden izole edilmiştir. Yavaş ürediği ve skotokromojenik olduğu tespit edilen bu türün fenotipik olarak *M. gordonae* türüne çok benzediği belirtilmiştir. Ancak *M. paragordoniae* en iyi 25-30 °C'de üremesi, Middlebrook 7H10 besiyerine yapılan pasajlarda 37 °C'de üreyememesi gibi özelliklerle fenotipik olarak *M. gordonae* türünden ayrılmaktadır. Kim ve ark. yaptıkları 16S rRNA dizi analizinde 1393 bp'lik gen bölgesini analiz etmişler, *M. paragordoniae* ve *M. gordonae* türleri için diziler arasında %99 düzeyinde benzerlik saptamışlardır. İki türün MALDI-TOF MS lipit analizleri, hsp65 ve rpoB bölgeleri ile yapılan filogenetik analizleri sonucunda ise birbirinden farklı türler olduğu anlaşılmıştır (142). *M. paragordoniae* GenoType Mycobacterium CM/AS ile tanımlanabilen türler arasında yer almamaktadır (124,125). MALDI-TOF MS ile *M. paragordoniae* olarak tanımlanan 3 izolatın GenoType Mycobacterium CM/AS ile *M. gordonae* olarak tanımlanması bu iki tür arasındaki filogenetik yakınlıktan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle çalışmamızdaki bu izolatların sonuçları iki test için uyumlu kabul edildi. Ayrıca genetik olarak birbirine yakınlık

gösteren bu iki türü ayırt edebilmesi MALDI-TOF MS yöntemi için olumlu bir özellik olarak görünmektedir. Akyar ve ark. tarafından yapılan çalışmada Bruker MALDI-TOF MS yöntemi, 16S rRNA/hsp65 dizi analizi ile tanımlanan *M. gordonae* ve *M. paragordonae* izolatlarını sırasıyla %94 ve %80 doğrulukla tanımlamıştır (12).

Çalışmamızda GenoType Mycobacterium CM/AS ile *M. intracellulare* olarak tanımlanan 9 izolat Bruker MALDI-TOF MS ile çalışıldığında 7'si (%78) "*M. chimaera-intracellulare* group", 2'si (%22) ise *M. colombiense* olarak tanımlandı. *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. vulneris*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. bouchedurhonense*, *M. yongonense*, *M. paraintracellulare* ve *M. lepraemurium* MAK içinde yer alan türlerdir (143). GenoType Mycobacterium CM testinde *M. chimaera* ve *M. intracellulare* aynı bant paternini gösterdiği için *M. chimaera* türü *M. intracellulare* olarak tanımlanmaktadır (124). *M. intracellulare* ve *M. chimaera* çalışmada kullandığımız MBT Mycobacteria Library v6.0 kütüphanesinde ayrı birer tür olarak yer almaktadır. Ancak iki türün kütle spektrumları birbirine çok benzediği için bu türlerin "*M. chimaera-intracellulare* group" olarak tanımlandığı belirtilmiştir. Bu türleri tür düzeyinde tanımlayabilmek için ek bir testin uygulanması gerektiği ifade edilmiştir (127). Bu nedenlerden ötürü çalışmamızda MALDI-TOF MS ile "*M. chimaera-intracellulare* group" olarak tanımlanan 7 izolatın sonucu bu iki test için uyumlu kabul edildi.

Pranada ve ark. tarafından yapılan çalışmada *M. chimaera* ve *M. intracellulare* türlerine ait referans suşlar ve klinikten elde edilen suşlar kullanılarak Bruker MALDI-TOF MS ile bu türler çalışılmıştır. FlexAnalysis 3.4 yazılımı kullanılarak iki tür için ortak olan ve her iki tür için de özgül olan spektrumların görsel olarak değerlendirildiği ve bunların kalibrasyonunun yapıldığı ifade edilmiştir. ClinProTools 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) ve MALDI Biotyper PeakShift Prototype yazılımları ile farklı tanımlama modelleri oluşturulmuş ve bu şekilde bu iki türe ait izolatların tür düzeyinde tanımlanabildiği belirtilmiştir (144).

16S rRNA dizi analizinde *M. chimaera* ve *M. intracellulare* arasında 1 bp'lik fark bulunmaktadır. Birbirine filogenetik olarak bu kadar yakın olan iki türün tanımlanmasında gerek nükleik asit hibridizasyon testleriyle, gerekse MALDI-TOF MS ile zorluk yaşanmaktadır (144). Ancak epidemiyolojik verinin, enfeksiyon odaklarının ve kontaminasyonun doğru belirlenmesi, ayrıca salgın takibi yapılması açısından tür düzeyinde tanımlama önem taşımaktadır. Avrupa ve ABD'de kalp cerrahisinde kullanılan ısıtıcı-

soğutucu cihazların *M. chimaera* türüyle kontaminasyonu sonucunda gerçekleşen salgınlar göz önünde bulundurulduğunda tür düzeyinde tanımlamanın önemi daha iyi anlaşılmaktadır (145). Bu nedenle çalışmamız sonucunda hem nükleik asit hibridizasyon testlerinde, hem de MALDI-TOF MS yönteminde bu türün tanımlanması konusunda iyileştirme gereksinimi olduğu düşünüldü.

M. colombiense türü de MAK içinde yer alan ve nadiren enfeksiyona yol açan bir türdür (146). İlk kez 2006 yılında Kolombiya’da HIV pozitif bir hastanın balgam ve kan örneğinden izole edilmiştir (146,147). Pnömoni, lenfadenopati ve yaygın hastalık şeklinde sporadik olgulara neden olduğu bildirilmiştir (146). GenoType Mycobacterium CM/AS testiyle *M. colombiense* türü tanımlanamamaktadır (124,125). Bu nedenle çalışmamızda MALDI-TOF ile *M. colombiense* olarak tanımlanan 2 izolatın GenoType Mycobacterium testiyle *M. intracellulare* olarak tanımlanmasının iki türün birbirine filogenetik olarak yakın türler olmasına bağlı olduğu düşünüldü. Bu nedenle bu 2 izolatın sonucu da iki test için uyumlu olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamızda GenoType Mycobacterium CM/AS testiyle *M. szulgai* olarak tanımlanan 3 izolatın 2’si (%66,6) Bruker MALDI-TOF MS ile tanımlanamadı, 1 izolat (%33,3) ise *M. lentiflavum* olarak tanımlandı. Bu 3 izolatın sonucu iki test için uyumsuz olarak kabul edildi. Akyar ve ark. tarafından yapılan çalışmada Bruker MALDI-TOF MS ile çalışılan 3 *M. szulgai* izolatının tamamı (%100) tür düzeyinde doğru tanımlanmıştır. Bu çalışmada kütüphane olarak MBT ML 4.0 Library kullanılmıştır (12). Bruker MALDI-TOF MS yöntemi için kullandığımız MBT Mycobacteria Library v5.0 kütüphanesinde daha önceden yer alan 17 spektrumdan 2’sinin kütüphaneden çıkarıldığı, v6.0 için de durumun bu şekilde devam ederek 15 *M.szulgai* spektrumunun kütüphanede bulunduğu ifade edilmiştir (127). Kütüphaneden bu spektrumların çıkarılması çalışmamızdaki *M. szulgai* izolatlarının doğru tanımlanamamasına neden olmuş olabilir. Ekstraksiyon protokolü ve kütüphanede yapılacak iyileştirmeler bu türün tanımlanmasındaki sorunlara çözüm getirebilir. Ancak bu konu hakkında bir sonuca varabilmek için daha fazla *M. szulgai* izolatının yer aldığı MALDI-TOF MS çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda yer alan iki testin bir hasta için maliyet ve test süresi parametreleri karşılaştırıldı. Bruker MALDI-TOF MS yaklaşık 90 dakikada sonuçlanırken GenoType Mycobacterium CM/AS testi 5 saatlik bir sürede sonuç vermektedir. MALDI-TOF MS

laboratuvarın rutin iş akışı içerisinde kolaylıkla kullanılabilen ve kısa sürede sonuç veren bir yöntem özelliği taşımaktadır. İki testin hasta başı maliyet değerleri Bruker MALDI-TOF MS için 1 \$, GenoType Mycobacterium CM/AS için 25 \$ olarak hesaplandı. Bu yönüyle de MALDI-TOF MS maliyet etkin bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. GenoType Mycobacterium CM/AS ile toplam 30 mikobakteri türü tanımlanabilirken, Bruker MALDI-TOF MS için bu sayı 178'dir. Bu özelliğiyle MALDI-TOF MS yönteminin mikobakteriler için daha detaylı veritabanına sahip bir yöntem olduğu sonucuna vardık.

Sonuç olarak TDM'lerin dünyada insidansının artması, antitüberküloz ilaçlara dirençli olmaları, tedavi protokolünün türe göre değişmesi ve doğru epidemiyolojik veri ihtiyacı tür düzeyinde tanımlamayı gerekli kılmaktadır. MALDI-TOF MS yöntemi TDM'leri tür düzeyinde tanımlamak için maliyeti uygun, uygulaması kolay, kısa sürede sonuç veren ve güvenilir bir yöntemdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanmasında MALDI-TOF MS kütle spektrum analizi prensibiyle çalışan yeni bir alternatiftir. Bizim çalışmamızda MALDI-TOF MS yöntemi TDM'lerin tanısında sıklıkla kullanılan bir yöntem olan nükleik asit hibridizasyon yöntemiyle % 95.2 uyum gösterdi. Birbirine filogenetik olarak yakın türleri tanımlamada Bruker MALDI-TOF MS yönteminin, GenoType Mycobacterium CM/AS yöntemine göre daha başarılı olduğu tespit edildi. MALDI-TOF MS devamlı güncellenen kütüphanesiyle yeni mikobakteri türlerini tanımlamak için de uygun bir yöntem olarak görünmektedir. MALDI-TOF MS yönteminin çalışmamızdaki *M. szulgai* türlerini tanımlamada yetersiz kaldığı görüldü. Ancak bu türden 3 izolat çalışmamızda yer aldığından bu türden daha fazla izolatin yer aldığı çalışmaların yol gösterici olacağı görüşündeyiz. MALDI-TOF MS *M. chimaera* ve *M. intracellulare* türlerini bir grup olarak tanımlamaktadır. Güncel ve kapsamlı kütüphane varlığı yöntemin başarısını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle MALDI-TOF MS kütüphanesinde iyileştirmeler yapılmasının testin performansını artıracığı düşünüldü.

Çalışmamızın kısıtlı yönü TDM'leri tür düzeyinde tanımlamak için altın standart yöntem olarak kabul edilen dizi analizi yönteminin çalışmada yer almamasıdır. Bu nedenle MALDI-TOF MS için çalışmamızda duyarlılık ve özgüllük değerleri saptanamadı. Ayrıca iki test için uyumsuz olarak sonuçlanan izolatlar için hangi testin doğru tanımlama yaptığını öğrenemememiz de bu kısıtlılığının bir sonucudur. Bir diğer kısıtlı yön de bazı türler için çalışmada az sayıda izolatin yer alması ve bazı türlerden izolatların yer almamasıdır.

Sonuç olarak MALDI-TOF MS yöntemi uygulaması kolay, hızlı sonuçlanan, düşük maliyetli ve güvenilir bir yöntemdir. MALDI-TOF MS yönteminin TDM'lerin rutin tanısına uygun bir yöntem olduğu, tanıyı hızlandırarak doğru antimikrobiyal tedaviyi sağlayacağı, hastanede kalış süresini kısaltacağı ve epidemiyolojik olarak doğru verinin elde edilmesine yardımcı olacağı düşünüldü. TDM'lerin MALDI-TOF MS yöntemiyle tür düzeyinde tanımlanmasına yönelik daha fazla sayıda ve farklı türlerde izolat içeren çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria a review. *Clin Chest Med* [Internet]. 2015;36(1):13–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.002>
2. Kendall BA, Winthrop KL. Update on the epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34(1):87–94.
3. Jarzembowski J, Young M. Nontuberculous mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(8):1333–41.
4. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am* [Internet]. 1959;43(1):273–90. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)34193-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7125(16)34193-1)
5. Falkinham JO. Ecology of nontuberculous mycobacteria-where do human infections come from? *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34(1):95–102.
6. Nishiuchi Y, Iwamoto T, Maruyama F. Infection sources of a common non-tuberculous mycobacterial pathogen, *Mycobacterium avium* complex. *Front Med*. 2017;4(MAR).
7. Misch EA, Saddler C, Davis JM. Skin and Soft Tissue Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria. *Curr Infect Dis Rep*. 2018;20(4).
8. Hoefsloot W, Van Ingen J, Andrejak C, Ängeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*. 2013;42(6):1604–13.
9. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):367–416.
10. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Bo EC. Two-Laboratory Collaborative Study on Identification of.pdf. 1996;34(2):296–303.
11. El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-Assisted laser desorption/ionization Time-Of-Flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One*. 2011;6(9).

12. Akyar I, Çavuşoğlu C, Ayaş M, Sürücüoğlu S, İlki A, Kaya DE, et al. Evaluation of the performance of maldi-tof ms and dna sequence analysis in the identification of mycobacteria species. *Turkish J Med Sci*. 2018;48(6):1351–7.
13. Leyer C, Gregorowicz G, Mougari F et al. Comparison of Saramis 4.12 and IVD 3.0 Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Mycobacteria from Solid and Liquid Culture Media. *J Clin Microbiol*. 2017;55(7):2045–54.
14. Şamlı A, İlki A. Comparison of MALDI-TOF MS, nucleic acid hybridization and the MPT64 immunochromatographic test for the identification of *M. tuberculosis* and non-tuberculosis Mycobacterium species. *New Microbiol*. 2016;39(4):259–63.
15. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis*. 1979;119(1):107–59.
16. Field SK, Fisher D, Cowie RL. Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patient without HIV infection. *Chest* [Internet]. 2004;126(2):566–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.126.2.566>
17. Griffith DE. Nontuberculous Mycobacterial Disease: An Introduction and Historical Perspective. In: *Nontuberculous Mycobacterial Disease, A Comprehensive Approach to Diagnosis and Management*, Humana Press. 2019. p. 1–9.
18. Hawkins CC, Gold JW, Whimbey E, Kiehn TE, Brannon P, Cammarata R, Brown AE AD. Mycobacterium avium complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med*. 1986;105(2):184–8.
19. Wayne LG, Kubica GP. Mycobacteria. In: *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. In: vol. 2. Baltimore; 1986. p. 1435–57.
20. Jorgensen JH, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015.
21. Ichiyama S, Shimokata K TM. Relationship between mycobacterial species and their carotenoid pigments. *Microbiol Immunol*. 1988;32(5):473–9.
22. Saviola B. Pigments and Pathogenesis. *J Mycobact Dis*. 2014;4:5.

23. Tran T, Dawrs SN, Norton GJ, Viridi R, Honda JR. Brought to you courtesy of the red, white, and blue–pigments of nontuberculous mycobacteria. *AIMS Microbiol.* 2020;6(4):434–50.
24. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:29–63.
25. Jackson M. The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(10):1–22.
26. Ghazei C. Mycobacterium tuberculosis and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J Res Med Sci.* 2018;23:63.
27. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC WG. Mycobacteria. In: Koneman’s color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Seventh ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2017. p. 1219–68.
28. Philley J V., Griffith DE. Treatment of slowly growing mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):79–90.
29. De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis.* 2006;42(12):1756–63.
30. Erbaycu AE, Dereli MŞ, Çakan A, Özsöz A, Erbaycu O, Badak Z. Aktif Akciğer Tüberkülozu Tanısı Alan , Löwenstein Kültürü Pozitif Olgularda Mikobakterilerin Nükleik Asit Çoğaltma ve Biyokimyasal Yöntemler ile İdentifikasyonu. *Tüberküloz ve Toraks Derg.* 2001;49(3):321–6.
31. Woods GL, Washington JA. Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis.* 1987;9(2):275–94.
32. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson MC, Salfinger M, et al. Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(2):1–66.
33. Marras TK, Chedore P, Ying AM, Jamieson F. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. *Thorax.* 2007;62(8):661–6.
34. Moore JE, Kruijshaar ME, Ormerod LP, Drobniowski F, Abubakar I. Increasing reports

- of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. *BMC Public Health*. 2010;10.
35. Winthrop KL, McNelley E, Kendall B, Marshall-Olson A, Morris C, Cassidy M, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: An emerging public health disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(7):977–82.
 36. Thomson RM. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(10):1576–83.
 37. Lai CC, Tan CK, Chou CH, Hsu HL, Liao CH, Huang YT, et al. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(2):294–6.
 38. Lee H, Myung W, Koh WJ, Moon SM, Jhun BW. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infection, South Korea, 2007-2016. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(3):569–72.
 39. Gerogianni I, Papala M, Kostikas K, Petinaki E, Gourgoulianis KI. Epidemiology and clinical significance of mycobacterial respiratory infections in Central Greece. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(7):807–12.
 40. Gitti Z, Mantadakis E, Maraki S, Samonis G. Clinical significance and antibiotic susceptibilities of nontuberculous mycobacteria from patients in Crete, Greece. *Future Microbiol*. 2011;6(9):1099–109.
 41. Andréjak C, Thomsen V, Johansen IS, Riis A, Benfield TL, Duhaut P, et al. Nontuberculous pulmonary mycobacteriosis in Denmark: Incidence and prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(5):514–21.
 42. Van Ingen J, Bendien SA, De Lange WCM, Hoefsloot W, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ, et al. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax*. 2009;64(6):502–6.
 43. McCallum AD, Watkin SW, Faccenda JF. Non-tuberculous mycobacterial infections in the Scottish borders: Identification, management and treatment outcomes - A retrospective review. *J R Coll Physicians Edinb*. 2011;41(4):294–303.

44. Jankovic M, Samarzija M, Sabol I, Jakopovic M, Katalinic Jankovic V, Zmak L, et al. Geographical distribution and clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria in Croatia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17(6):836–41.
45. Dailoux M, Abalain ML, Laurain C, Lebrun L, Loos-Ayav C, Lozniewski A, et al. Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients. *Eur Respir J.* 2006;28(6):1211–5.
46. Bodle EE, Cunningham JA, Della-Latta P, Schluger NW, Saiman L. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in patients without HIV infection, New York City. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(3):390–6.
47. Pedro HDSP, Pereira MIF, Goloni MDRA, Ueki SYM, Chimara E. Nontuberculous mycobacteria isolated in São José do Rio Preto, Brazil between 1996 and 2005. *Nontuberculous Mycobact Isol São José do Rio Preto, Brazil between 1996 2005.* 2008;34(11):950–5.
48. Kennedy MP, O'Connor TM, Ryan C, Sheehan S, Cryan B, Bredin C. Nontuberculous mycobacteria: Incidence in Southwest Ireland from 1987 to 2000. *Respir Med.* 2003;97(3):257–63.
49. Al-Mahruqi SH, Van Ingen J, Al-Busaidy S, Boeree MJ, Al-Zadjali S, Patel A, et al. Clinical relevance of nontuberculous mycobacteria, Oman. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(2):292–4.
50. Zamarioli LA, Coelho AGV, Pereira CM, Nascimento ACC, Ueki SYM, Chimara E. Descriptive study of the frequency of nontuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. *J Bras Pneumol.* 2008;34(8):590–4.
51. da Costa ARF, Falkinham JO, Lopes ML, Barretto AR, Felicio JS, Sales LHM, et al. Occurrence of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Infection in an Endemic Area of Tuberculosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7).
52. Davies BS, Roberts CH, Kaul S, Klein JL, Milburn HJ. Non-tuberculous slow-growing mycobacterial pulmonary infections in non-HIV-infected patients in south London. *Scand J Infect Dis.* 2012;44(11):815–9.
53. Braun E, Sprecher H, Davidson S, Kassis I. Epidemiology and clinical significance of

- non-tuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17(1):96–9.
54. Varghese B, Memish Z, Abuljadayel N, Al-Hakeem R, Alrabiah F, Al-Hajoj SA. Emergence of Clinically Relevant Non-Tuberculous Mycobacterial Infections in Saudi Arabia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5):3–7.
55. Wang CC, Lin MC, Liu JW, Wang YH. Nontuberculous mycobacterial lung disease in southern Taiwan. *Chang Gung Med J.* 2009;32(5):499–508.
56. Biçmen C, Coşkun M, Gündüz AT, Şenol G, Çırak AK, Tibet G. Nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: Causative agent or not? *New Microbiol.* 2010;33(4):399–403.
57. Günaydın M, Yanık K, Eroğlu C, Saniç A, Ceyhan İ, Erturan Z, et al. Distribution of Nontuberculous Mycobacteria strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013;12(1):12–7.
58. Türkel S. Klinik örneklerden izole edilen tüberküloz dışı mikobakterilerin dizi analizi ile tanımlanması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. Tıpta Uzmanlık Tezi; 2013.
59. Özkarataş MH, Esen N, Özkütük AA. Four years period follow-up of non-tuberculous mycobacteria in a university hospital. *Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg.* 2018;48(3):205–10.
60. Özçolpan OO, Sürücüoğlu S, Özkütük N, Çavuşoğlu C. Klinik örneklerden soyutlanan ve DNA dizi analizi ile tanımlanan tüberküloz dışı mikobakterilerin dağılımı. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(4):484–93.
61. Albayrak N, Şimşek H, Sezen F, Arslantürk A, Tarhan G, Ceyhan İ. Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında 2009-2010 Yıllarında Tespit Edilen Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Dağılımlarının İrdelenmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2012;46(4):560–7.
62. Koshksaray FK. Çukurova Bölgesindeki Klinik Örneklerde Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) Tür Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana. Yüksek Lisans Tezi; 2015.

63. Emikoğlu Cerit ŞK. Solunum yolu örneklerinden izole edilen tüberküloz dışı mikobakterilerin PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanması. Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman. Yüksek Lisans Tezi; 2021.
64. Falkinham JO. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med* [Internet]. 2015;36(1):35–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.003>
65. Iivanainen EK, Martikainen PJ, Räisänen ML, Katila ML. Mycobacteria in boreal coniferous forest soils. *FEMS Microbiol Ecol*. 1997;23(4):325–32.
66. Iivanainen E, Sallantausta T, Katila M, Martikainen PJ. Mycobacteria in Runoff Waters from Natural and Drained Peatlands. *J Environ Qual*. 1999;28(4):1226–34.
67. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun*. 1997;65(9):3759–67.
68. Faria S, Joao I, Jordao L. General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. *J Pathog*. 2015;2015:1–10.
69. Mullis SN, Falkinham JO. Adherence and biofilm formation of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* to household plumbing materials. *J Appl Microbiol*. 2013;115(3):908–14.
70. Taylor RH, Falkinham JO, Norton CD, LeChevallier MW. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(4):1702–5.
71. Jeon D. Infection source and epidemiology of nontuberculous mycobacterial lung disease. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2019;82(2):94–101.
72. Thomson R, Tolson C, Carter R, Coulter C, Huygens F, Hargreaves M. Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM. *J Clin Microbiol*. 2013;51(9):3006–11.

73. Satta Y, Yamashita M, Matsuo Y, Kiyokawa H, Sato Y, Takemura H, et al. Non-tuberculous mycobacterial pseudo-outbreak of an intestinal culture specimen caused by a water tap in an endoscopy unit. *Intern Med.* 2020;59(22):2811–5.
74. Benwill JL, Wallace RJ. Infections due to nontuberculous mycobacteria. *Infect Cent Nerv Syst Fourth Ed.* 2014;03756.
75. Allen KB, Yuh DD, Schwartz SB, Lange RA, Hopkins R, Bauer K, et al. Nontuberculous Mycobacterium Infections Associated With Heater-Cooler Devices. *Ann Thorac Surg.* 2017;104(4):1237–42.
76. Sommerstein R, Rüegg C, Kohler P, Bloemberg G, Kuster SP, Sax H. Transmission of Mycobacterium chimaera from heater-cooler units during cardiac surgery despite an ultraclean air ventilation system. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(6):1008–13.
77. Ricketts W, Shaughnessy T VIJ. Human-to-human transmission of Mycobacterium kansasii or victims of a shared source. . *Eur Respir J* ;44 1085–7. 2014;44:1085–7.
78. Falkinham JO. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(3):419–24.
79. Ryu YJ, Koh WJ, Daley CL. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease: Clinicians’ perspectives. *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2016;79(2):74–84.
80. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR). Aydoğdu Ofset Matbaacılık. Ankara, 2014.
81. Leber AL. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* 4th ed. Washington, DC: ASM Press; 2016.
82. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P. Pretreatment of clinical specimens with sodium dodecyl (Lauryl) sulfate is not suitable for the mycobacteria growth indicator tube cultivation method. *J Clin Microbiol.* 1997;35(8):2142–4.
83. https://phil.cdc.gov/PHIL_Images/20040615/d094324845a24eb3a7bfe0d1f8e4a637/57

89_lores.jpg.

84. Kent P.T. KGP. Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control; 1985;96–103. Available from:
<https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/PB86216546.xhtml>
85. Van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med.* 2013;34(1):103–9.
86. Gruft H, Loder A. Enhancing effects of carbon dioxide on the primary isolation of acid-fast bacilli in a modified Lowenstein-Jensen medium. *Appl Microbiol.* 1971;22(5):944–5.
87. Stephenson D, Perry A, Appleby MR, Lee D, Davison J, Johnston A, et al. An evaluation of methods for the isolation of nontuberculous mycobacteria from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and patients assessed for lung transplantation. *BMC Pulm Med.* 2019;19(1):1–12.
88. Brown-Elliott BA, Molina S, Fly T, Njie O, Stribley P, Stephenson D, et al. Evaluation of a novel rapidly-growing mycobacteria medium for isolation of *Mycobacterium abscessus* complex from respiratory specimens from patients with bronchiectasis. *Heliyon* [Internet]. 2019;5(10):e02684. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02684>
89. Rotcheewaphan S, Odusanya OE, Henderson CM, Stephenson D, Olivier KN, Perry JD, et al. Performance of RGM medium for isolation of nontuberculous mycobacteria from respiratory specimens from non-cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2019;57(2):1–9.
90. Sewell DL, Rashad AL, Rourke WJ, Poor SL, McCarthy JAC, Pfaller MA. Comparison of the Septi-Chek AFB and BACTEC systems and conventional culture for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1993;31(10):2689–91.
91. Conville PS, Witebsky FG. Inter-bottle transfer of mycobacteria by the BACTEC 460. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1989;12(5):401–5.
92. Brittle W, Marais BJ, Hesselting AC, Schaaf HS, Kidd M, Wasserman E, et al.

- Improvement in mycobacterial yield and reduced time to detection in pediatric samples by use of a nutrient broth growth supplement. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1287–9.
93. Bhalla GS, Sarao MS, Kalra D, Bandyopadhyay K, John AR. Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria. *Pract Lab Med.* 2018;12(March).
 94. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):727–52.
 95. Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology.* 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007.
 96. Slany M, Pavlik I. Molecular detection of nontuberculous mycobacteria: Advantages and limits of a broad-range sequencing approach. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2012;22(4):268–76.
 97. Adékambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5699–708.
 98. McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3000–11.
 99. Williams KJ, Ling CL, Jenkins C, Gillespie SH, McHugh TD. A paradigm for the molecular identification of *Mycobacterium* species in a routine diagnostic laboratory. *J Med Microbiol.* 2007;56(5):598–602.
 100. Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: Report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1993;31(11):2882–9.
 101. Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, Roberts GD. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1447–53.

102. Mohamed AM, Kuyper DJ, Iwen PC, Ali HH, Bastola DR, Hinrichs SH. Computational approach involving use of the internal transcribed spacer 1 region for identification of *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):3811–7.
103. Lee H, Bang HE, Bai GH, Cho SN. Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):2213–8.
104. Adékambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(1):133–43.
105. Adékambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, La Scola B, Raoult D, et al. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5493–501.
106. Peixoto ADS, Montenegro LML, Lima AS, Melo FL, Barbosa Júnior WL, Neves MMC, et al. Identification of nontuberculous mycobacteria species by multiplex real-time PCR with high-resolution melting. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20200211.
107. Kim SH, Shin JH. Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, *hsp65*, and *rpoB*. *J Clin Lab Anal.* 2018;32(1):1–6.
108. Devallois A, Khye Seng Goh, 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):2969–73.
109. Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: Improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4418–20.
110. Blauwendraat C, Dixon GLJ, Hartley JC, Foweraker J, Harris KA. The use of a two-gene sequencing approach to accurately distinguish between the species within the *Mycobacterium abscessus* complex and *Mycobacterium chelonae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(8):1847–53.

111. Richter E, Rüsç-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the genotype mycobacterium assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1769–75.
112. Lee AS, Jelfs P, Sintchenko V, Gilbert GL. Identification of non-tuberculous mycobacteria: Utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. *J Med Microbiol.* 2009;58(7):900–4.
113. Gitti Z, Neonakis I, Fanti G, Kontos F, Maraki S, Tselentis Y. Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS assays to analyze 76 nontuberculous mycobacterial isolates from Greece. *J Clin Microbiol.* 2006;44(6):2244–6.
114. Fukushima M, Kakinuma K, Hayashi H, Nagai H, Ito K, Kawaguchi R. Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2605–15.
115. Eser B. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *J Heal Serv Educ.* 2018;2(2):51–7.
116. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of mycobacterium species. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):704–26.
117. Lavigne JP, Espinal P, Dunyach-Remy C, Messad N, Pantel A, Sotto A. Mass spectrometry: A revolution in clinical microbiology? *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(2):257–70.
118. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1549–54.
119. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3482–6.
120. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of mycobacteria in

- solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):1790–4.
121. Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceyskens PJ, Coll P, Corcoran D, et al. How to: identify non-tuberculous *Mycobacterium* species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(6):599–603.
 122. Van Eck K, Faro D, Wattenberg M, De Jong A, Kuipers S, Van Ingen J. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry fails to identify nontuberculous mycobacteria from primary cultures of respiratory samples. *J Clin Microbiol.* 2016;54(7):1915–7.
 123. Rodriguez-Temporal D, Perez-Risco D, Struzka EA, Mas M, Alcaide F. Impact of updating the MALDI-TOF MS database on the identification of nontuberculous mycobacteria. *J Mass Spectrom.* 2017;52(9):597–602.
 124. Hain LifeScience. *GenoType Mycobacterium CM Instructions for Use.* 2014;1–12. Available from: www.hain-lifescience.com/products/msds.html
 125. Hain LifeScience. *GenoType Mycobacterium AS Molecular Genetic Assay for Identification Mycobacterial Species from Cultured Material v1.0.* 2010;1–18.
 126. Bruker Daltonics. *Standard Operating Procedure Mycobacteria Extraction (Mycoex) Method Revision 3.* Bremen, Almanya: Bruker Daltonik GmbH; 2014.
 127. Bruker Daltonics. *Mycobacteria Library v6.0 Release Notes: 1-10.* Bremen, Almanya: Bruker Daltonik GmbH; 2019.
 128. Mei Y, Zhang Q, Zhang W, Jiang H, Shi Y, Xiong J, et al. Isolation of Novel *Mycobacterium* Species from Skin Infection in an Immunocompromised Person. 2021;27(11):2944–7.
 129. Barış A, Bayraktar B. Identification of *Mycobacterial* strains isolated from clinical specimens via hsp65 PCR-RFLP method. *Şişli Etfal Hastan Tıp Bülteni.* 2019;54(3):364–70.
 130. Keikha M, Ghazvini K. Comment on “nontuberculous mycobacterial infection after lung transplantation: a report of four cases.” *Surg Case Reports.* 2019;5(1):4–5.

131. Alcolea-Medina A, Fernandez MTC, Montiel N, García MPL, Sevilla CD, North N, et al. An improved simple method for the identification of Mycobacteria by MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption- Ionization mass spectrometry). *Sci Rep.* 2019;9(1):5–10.
132. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015;6(AUG):1–16.
133. Mediavilla-Gradolph MC, De Toro-Peinado I, Bermúdez-Ruiz MP, García-Martínez MDLÁ, Ortega-Torres M, Montiel Quezel-Guerraz N, et al. Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens. *Biomed Res Int.* 2015;2015:6–11.
134. Costa-Alcalde JJ, Barbeito-Castiñeiras G, González-Alba JM, Aguilera A, Galán JC, Pérez-del-Molino ML. Comparative evaluation of the identification of rapidly growing non-tuberculous mycobacteria by mass spectrometry (MALDI-TOF MS), GenoType Mycobacterium CM/AS assay and partial sequencing of the *rpoB* gene with phylogenetic analysis as a reference method. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019;37(3):160–6.
135. Genç GE, Demir M, Yaman G, Kayar B, Köksal F, Satana D. Evaluation of MALDI-TOF MS for identification of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens in mycobacteria growth indicator tube medium. *New Microbiol.* 2018;41(3):214–9.
136. Sriram R, Sahni AK, Dudhat VL, Pujahari AK. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of Mycobacterium abscessus. *Med J Armed Forces India [Internet].* 2018;74(1):22–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mjafi.2017.02.006>
137. Nash KA, Brown-Elliott AB, Wallace RJ. A Novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of mycobacterium abscessus but is absent from mycobacterium chelonae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1367–76.
138. Kim SY, Moon SM, Jhun BW, Jung Kwon O, Huh HJ, Lee NY, et al. Species distribution and macrolide susceptibility of mycobacterium fortuitum complex clinical

- isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(6).
139. Tsukamura M, Nemoto H. *Mycobacterium porcinum*. 1983;162–5.
 140. Mugetti D, Tomasoni M, Pastorino P, Esposito G, Menconi V, Dondo A, et al. Gene sequencing and phylogenetic analysis: Powerful tools for an improved diagnosis of fish mycobacteriosis caused by mycobacterium fortuitum group members. *Microorganisms.* 2021;9(4).
 141. Patil R, Patil T, Schenfeld L, Massoud S. *Mycobacterium Porcinum* peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Gen Intern Med.* 2011;26(3):346–8.
 142. Kim BJ, Hong SH, Kook YH, Kim BJ. *Mycobacterium paragordoniae* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species closely related to *Mycobacterium gordonae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(PART 1):39–45.
 143. Van Ingen J, Turenne CY, Tortoli E, Wallace RJ, Brown-Elliott BA. A definition of the *Mycobacterium avium* complex for taxonomical and clinical purposes, a review. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018;68(11):3666–77.
 144. Pranada AB, Witt E, Bienia M, Kostrzewa M, Timke M. Accurate differentiation of *Mycobacterium chimaera* from *Mycobacterium intracellulare* by MALDI-TOF MS analysis. *J Med Microbiol.* 2017;66(5):670–7.
 145. van Ingen J, Kohl TA, Kranzer K, Hasse B, Keller PM, Katarzyna Szafrńska A, et al. Global outbreak of severe *Mycobacterium chimaera* disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(10):1033–41.
 146. Yu X, Jiang W. *Mycobacterium colombiense* and *Mycobacterium avium* complex causing severe pneumonia in a patient with HIV identified by a novel molecular-based method. *Infect Drug Resist.* 2021;14:11–6.
 147. Murcia MI, Tortoli E, Menendez MC, Palenque E, Garcia MJ. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(9):2049–54.

8.EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr.Nuran Esen

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	5630-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input checked="" type="checkbox"/> MÜNFERİT ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/> YÜKSEKLİSANS <input type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon/İyonizasyon-Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi- Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry(MALDI- TOF MS) İle Mikobakterilerin Tür Tayini
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Nuran Esen Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2020/22-23	Tarih:21.09.2020
	Prof.Dr.Nuran Esen'in sorumlusu olduğu "Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon/İyonizasyon-Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi- Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry(MALDI- TOF MS) İle Mikobakterilerin Tür Tayini" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu	

Ek 2. Filtresiz Tez İntihal Raporu

ORJİNALLİK RAPORU			
% 25	% 24	% 17	% 13
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	link.springer.com İnternet Kaynağı		% 2
2	www.mikrobiyolbul.org İnternet Kaynağı		% 1
3	tuberkuloz.thsk.saglik.gov.tr İnternet Kaynağı		% 1
4	journals.plos.org İnternet Kaynağı		% 1
5	www.eurosurveillance.org İnternet Kaynağı		% 1
6	medlib.mef.hr İnternet Kaynağı		% 1
7	doctiktak.com İnternet Kaynağı		<% 1
8	repozitorij.unizg.hr İnternet Kaynağı		<% 1
9	"Nontuberculous Mycobacterial Disease", Springer Science and Business Media LLC, 2019		<% 1

156

ÇAVUŞOĞLU, Cengiz, TURHAN, Ajda, YAYGIN, Yusuf Engin, DERİCİ, Yeşer, Karaca and BİLGİÇ, Altınay. "Tüberküloz dışı mikrobakteri izolatlarının tanımlanmasında INNO-LIPA mycobacteria, INNO-LIPA mycobacteriav2 ve hsp65 dizi analizinin karşılaştırılması", Mikrobiyoloji Derneği, 2005.

Yayın

<% 1

Alıntılarını çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart

Kapat

Ek 3. Filtreli Tez İntihal Raporu

ORJİNALLİK RAPORU

% **8**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **7**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **4**

YAYINLAR

% **3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

tuberkuloz.thsk.saglik.gov.tr

İnternet Kaynağı

% **1**

2

www.mikrobiyolbul.org

İnternet Kaynağı

% **1**

3

www.ncbi.nlm.nih.gov

İnternet Kaynağı

<% **1**

4

Submitted to Canakkale Onsekiz Mart
University

Öğrenci Ödevi

<% **1**

5

hdl.handle.net

İnternet Kaynağı

<% **1**

6

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

7

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<% **1**

8

David Rodriguez-Temporal, Daniel Perez-Risco, Eduardo A. Struzka, Mireia Mas, Fernando Alcaide. "Evaluation of Two Protein Extraction Protocols Based on Freezing and

<% **1**

Human Infections Come from?", Seminars in
Respiratory and Critical Care Medicine, 2013

Yayın

- 68 Jung-Yien Chien, Chong-Jen Yu, Po-Ren Hsueh. <% 1
"Identification of nontuberculous
mycobacteria in MGIT by matrix-assisted laser
desorption/ionization mass spectrometry",
Future Microbiology, 2016

Yayın

- 69 PELİT, Süleyman, GENÇ, Gonca ERKÖSE,
BARIŞ, Ayşe and ERTURAN, Zayre. <% 1
"Trichosporon Türlerinin Tanımlanmasında
Matriks Aracılı ", Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti,
2017.

Yayın

- 70 ÇAVUŞOĞLU, Cengiz, TURHAN, Ajda, YAYGIN,
Yusuf Engin, DERİCİ, Yeşer, Karaca and BİLGİÇ,
Altınay. "Tüberküloz dışı mikrobakteri
izolatlarının tanımlanmasında INNO-LIPA
mycobacteria, INNO-LIPA mycobacteriav2 ve
hsp65 dizi analizinin karşılaştırılması",
Mikrobiyoloji Derneği, 2005.

Yayın

Alıntıları çıkart

üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde