



T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKROBAKTERİLERİN PCR-RFLP  
(POLYMERASE CHAIN REACTION RESTRICTION FRAGMENT  
LENGTH POLYMORPHISM) İLE TİPLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TURAN NAJAFLI**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MERSİN  
TEMMUZ-2021**

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKROBAKTERİLERİN PCR-RFLP  
(POLYMERASE CHAIN REACTION RESTRICTION FRAGMENT  
LENGTH POLYMORPHISM) İLE TİPLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS**

**TURAN NAJAFLI**

ORCID ID: 0000-0002-7365-3593

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Gönül ASLAN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MERSİN**  
**TEMMUZ- 2021**

## ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

## ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

01 /01/ 2021

İmza / Signature



Turan NAJAFLI / Student Name and Surname

## ÖZET

### **Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism) İle Tiplendirilmesi**

Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM), günümüzde bağışıklık sistemini baskılayan hastalık ve tedavilerin artmasına bağlı olarak giderek artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak kaşımıza çıkmaktadır. Klinik açıdan önem taşıyan TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanması hızlı ve doğru bir şekilde yapılmalıdır. Aksi takdirde uygun olmayan tedavilere bağlı direnç gelişimi ve gereksiz yere ilaç kullanımından kaynaklanan toksisitenin oluşması söz konusudur. Günümüzde mikobakterilerin tanımlanmasında konvansiyonel kültür yöntemleri rutin mikobakteriyoloji laboratuvarında altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak rutin uygulamada mikobakterilerin identifikasyonu zaman alıcı ve yoğun işlemler gerektirmektedir. TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanabilmesi için ucuz, kolay ve hızlı sonuç veren yöntemlerin uygulanması, bu etkenler ile meydana gelen enfeksiyonların etkin bir şekilde tedavisine olanak sağlar. Bu çalışmada TDM'lerin Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ile kolay ve hızlı tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında 2015-2019 tarihleri arasında klinik örneğinin kültüründe üreme olan 296 koleksiyon suşu çalışmaya dahil edildi. TDM olduğu tespit edilen 47 izolat PCR-RFLP yöntemi ile tür düzeyinde tanımlandı.

Çalışmamızda TDM'lerin tür dağılımı: *Mycobacterium intracellulare* %1.35 (n=4), *Mycobacterium fortuitum* %1.01 (n=3), *Mycobacterium simiae* %0.68 (n=2), *Mycobacterium szulgai* %0.68 (n=2), *Mycobacterium kansasii* %0.34 (n=1), *Mycobacterium abscessus* %0.34 (n=1), *Mycobacterium scrofulaceum* %0.34 (n=1), *Mycobacterium gordonae* V %0.34 (n=1) olarak tespit edildi.

Çalışmamızda TDM'lerin identifikasyonuna olanak sağlayan PCR-RFLP yönteminin kliniğe hızlı bilgi vermek açısından, ucuz, kolay ve rutin kullanıma uygun bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Tüberküloz dışı mikobakteri (TDM); PZR-RFLP (Polimeraz zincir reaksiyonu-parça uzunluk polimorfizmi; hsp65 PZR).

## ABSTRACT

### Typing of Non-Tuberculosis Mycobacteria by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism)

Non-tuberculous mycobacteria (NTM), has been observed to be isolated as an infection agent in increasing frequency in accordance with the rise in diseases and treatments that suppress immune system. Rapid and accurate identification of clinically relevant NTM isolates to the species level is crucial as improper treatment may lead to drug resistance and unnecessary exposure to drug toxicity. Today, conventional culture methods for the identification of mycobacteria are still accepted as the gold standard in the routine mycobacteriology laboratory. However, identification of mycobacteria in routine application requires time-consuming and intensive processes. The clinical course and therapy can differ among different species of NTM. Cheap, fast and simple methods in identification of NTM species should be helpful to eliminate the pathogens cost effectively. In this study, easy and fast typing of NTM with Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) was aimed.

In this study, 296 collection strains that were reproduced in the culture of clinical samples between 2015-2019 in Mersin University Faculty of Medicine Medical Microbiology Laboratory were included in the study. 47 isolates determined to be NTM were identified at species level by PCR-RFLP method.

In our study, distribution of the identified species were as follows; *Mycobacterium intracellulare* %1.35 (n=4), *Mycobacterium fortuitum* %1.01 (n=3), *Mycobacterium simiae* %0.68 (n=2), *Mycobacterium szulgai* %0.68 (n=2), *Mycobacterium kansasii* %0.34 (n=1), *Mycobacterium gordonae* V %0.34 (n=1), *Mycobacterium abscessus* %0.34 (n=1), *Mycobacterium scrofulaceum* %0.34 (n=1).

In our study, it was concluded that the PCR-RFLP method, which allows the identification of NTM, is an inexpensive, easy and routine method in terms of providing rapid information to the clinic.

**Keywords:** Nontuberculous mycobacteria(NTM); PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism); hsp65 PCR.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren her konuda yardımını ve desteğini gördüğüm, tez çalışmasının planlanması ve gerçekleştirilmesinde her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen, çalışma boyunca öneri, eleştiri ve rehberlikleriyle yol gösteren çok değerli danışman hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN'a,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER'e, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğr. Gör. Leyla ERSOY'a,

Her türlü konuda desteğini ve yardımlarını esirgemeyen başta Toros Üniversitesi Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Efdal OKTAY GÜLTEKİN'e

Tez çalışmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalında çalışan tüm arkadaşlarıma, Sebahat Aslan Tek'e, Kevser Elçi'ye

Hayatıma girdiği günden bugüne her zaman yanımda olan, sabır ve anlayışıyla bu zorlu sürecin her saniyesini benimle paylaşan sevgili eşim Dr. Elvin NAJAFLI'ye ve varlığının hayatıma kattığı en büyük renk ve armağan ile bana yaşattığı sayısız mutluluk için oğullarım Altay ve Geray NAJAFLI'ye

sonsuz teşekkürlerimi ve yürekten sevgilerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b>	<b>3</b>
2.1. Tarihçe	3
2.2. Mikobakterilerin genel özellikleri	4
2.3. Mikobakterilerin hücre duvarı	6
2.4. Mikobakterilerin sınıflandırılması	7
2.5. Tüberkülozun tanısı	12
2.5.1. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) tanısı	16
2.5.1.1. Fenotipik Testler	17
2.5.1.2. Biyokimyasal Testler	17
2.5.1.3. Moleküler Yöntemler	19
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	<b>23</b>
3.1. Çalışma Grubu	23
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	23
3.3. Yöntem	24
3.3.1. Suş canlandırma	24
3.3.2. İmmünokromatografik yöntem	24
3.3.3. DNA İzolasyonu	25
3.3.4. PCR-Amplifikasyon aşaması	25
3.3.5. Parça Uzunluk Polimorfizmi Tekniği	25
<b>4. BULGULAR</b>	<b>30</b>
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>33</b>
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	44

## TABLolar DİZİNİ

---

	<b>Sayfa</b>
Tablo 2.1. Mikobakterilerin genel özellikleri	5
Tablo 2.2. TDM'lerin Runyon sınıflandırılması	7
Tablo 2.3. Direkt boyalı preparatların değerlendirilmesi	13
Tablo 3.2. Amplifikasyon koşulları	25
Tablo 3.3. Kesim reaksiyonu birleşenleri	26
Tablo 3.4 Mikobakteri tür değerlendirme cetveli	26
Tablo 4.1. PCR-RFLP ile analizi yapılan türlerin BstE II ve Hae III profilleri	31

---



## ŞEKİLLER DİZİNİ

---

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. . Mikobakterlerin hücre duvar yapısı	6
Şekil 4.1. TDM'lerin BstE II ve Hae III enzimleri ile kesilmiş bant görüntüleri	30

---



## KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
TB	Tüberküloz
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks
TDM	Tüberküloz dışı mikobakteriler
MOTT	Mycobacteria other than tuberculosis
PCR-RFLP	Polimeraz zincir reaksiyonu-parça uzunluk polimorfizmi
PAS	Para-aminosalisilik asit
INH	İzoniazid
PZA	Pirazinamid
EMB	Etambutol
RIF	Rifampisin
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> kompleks
LAM	Lipoarabinomannan
HIV	Human Immunodeficiency
NTM	Nontuberculous mycobacteria
BOS	Beyin omurilik sıvısı
EZN	Ehrlich Ziehl Neelsen
OADC	Oleic asit/Albumin/Dextrose/Catalase
LJ	Löwenstein-Jensen
BSA	Sığır albumini
PANTA	Polimiksin B, amfotersin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin
VT	Versa-Trek
TCH	Thiophene-2 karboksilik asit hidrazid
DNA	Deoksiribo nükleik asit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
PZT	Polimeraz zincir tepkimesi
PPi	Pirofosfat
TLC	Thin-layer chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
GLC	Gas liquid chromatography
PNB	Paranitrobenzoik asit
BAL	Bronkoalveolar lavaj
AMS	Açlık mide sıvısı
TMP-SMX	Trimetoprim-sulfametoksazol

**Kısaltma/Simgeler Tanım**

---



## 1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB) tüm dünyada ölüme neden olan 10 hastalıktan biridir. Tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen TB hala en önemli enfeksiyon hastalıklarından birisi olmaya devam etmektedir. Günümüzde az gelişmiş ülkelerin değil gelişmiş ülkelerin de en büyük sorunlarından birisini oluşturan TB bütün dünyada yaygın olarak görülmekte ve önemini korumaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), insan nüfusunun üçte birinin, TB'nin etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ile enfekte olduğunu tahmin etmektedir. 2019 verilerine göre, bu hastalıktan 2018 yılında 1,6 milyon insan yaşamını yitirmiştir [1].

*Mycobacterium tuberculosis* kompleksine (MTBC) dahil olmayan diğer mikobakteriler; Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) , non-tüberküloz mikobakteriler ( NTM) veya atipik mikobakteriler olarak adlandırılmaktadır [2]. TDM'ler çevrede yaygın olarak bulunan 160'dan fazla türü içermektedir. Doğal su kaynakları, hastane ve binaların sıcak su sistemleri ile çeşitli hayvanlar TDM' ler için kaynak olabilmektedir. Sağlıklı ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde başta solunum sistemi olmak üzere cilt, yumuşak dokular, lenfatik, kas-iskelet sistemi ve birçok sistemde hastalık oluşturabilirler. Hastalık etkeni olarak en sık karşılaşılan etkenler: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*'dur [3,4] .

Son döneme kadar mikobakterilerin mikrobiyolojik identifikasyonu klasik biyokimyasal belirteçler ile yapılmıştır. Bu testlerin yoğun emek gerektirmesi ve çoğu TDM türlerini tanımlayamaması sebebiyle kullanılmamaktadır. TDM'lerin büyük çoğunluğu klasik anti-TB ilaçlara karşı direnç göstermektedir. Tedaviye başlanmadan önce mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde tespit edilmesi önemlidir. Böylece hastanın gereksiz yere ilaç kullanması, hastanede kalış süresinin uzaması ve aynı zamanda ekonomik kayıpları önlemektedir. [2,5,6].

Moleküler yöntemler, bilimin birçok alanında olduğu gibi enfeksiyon hastalıklarının erken tanısı, mikroorganizmaların tür ve alt tür düzeyinde ayrımının yapılması, antibiyotiklere direncin saptanması, virülans genlerinin araştırılması, epidemilerin belirlenmesi ve izlenmesi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [7].

Mikobakterilerin hızlı identifikasyonunda moleküler yöntemlerden biri olan polimeraz zincir reaksiyonu-parça uzunluk polimorfizmi (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism PCR-RFLP) tekniği birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir. Klinik örneğin özgül besiyerine ekimi ile kültür yapılması sonucu mikobakteriler izole edilir. Sonra biyokimyasal testler kullanılarak TDM-MTBC ayrımı yapılır. Fenotipik özelliklerin ön planda bulunduğu bu yöntem ile tür tayini sınırlı sayıda türün tespitine izin vermektedir. Bu nedenle örnekte tespit edilen mikobakterilerin identifikasyonu için

biyokimyasal belirteçler yerine ileri metodlar tercih edilmektedir. Yapılan bir çalışmada PCR-RFLP metodunun laboratuvar kullanımına uygun, maliyeti düşük ve hızlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir [8].

Çalışmamızda, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikobakteriyoloji Laboratuvarında 2015-2019 yılları arasında klinik örneklerden izole edilen TDM'lerin PCR-RFLP yöntemi ile hızlı ve doğru bir şekilde tiplendirilmesi amaçlanmıştır.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

### 2.1. Tarihçe

Halk arasında verem hastalığı adıyla bilinen TB, farklı bölgelerde değişik tarihlerde epidemilere neden olmuştur [9]. TB'nin tarihinin 150 milyon yıl öncesine dayandığı ve TB'nin ilk olarak 3 milyon yıl önce Doğu Afrika'da meydana geldiği tahmin edilmektedir. MTBC'nin türlerinin kökeninin ise tahmini 15.000-35.000 yıl öncesinde görüldüğü bildirilmektedir [10]. İlk bilgiler Mısır mumyaları ve Ürdünde bulunan insan iskeletlerinde Pott hastalığı ve Psoas apseleri görülmesi, Nil yakınlarında bir mezarda (M.O.1500) lenf bezi TB'sine ait belgenin bulunması sayılabilir. Bulunan kişinin kemik grafisinde Pott hastalığına ait bulgular saptanmış ve örneklerde aside dirençli basiller görülmüştür [11]. M.S. 2. yüzyılda yaşayan Galen ise tedavi önerilerini ortaya koymuştur. Bu önerilere dinlenme, venden kan alımı, sülük uygulaması, göğüs yakıları, öskürüğün kesilmesi ve kabartıcı maddelerle ciltte yaralar oluşturmak gibi tedaviler aittir. Fitizisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonlarını Andreas Vesalius (M.S. 1478) bulmuştur. 1614-1672 yıllarda ise Franciscus Sylvius TB'den ölen hastaların akciğerlerinde küçük sert nodüller bulmuş ve onları tüberkul adlandırmıştır [12].

TB basili ilk kez 1882 yılında Berlin'de Robert Koch tarafından keşfedilmiştir. Robert Koch 1884 yılında tüberküloz basilini klinik örneklerden izole ederek, saf kültürünü yaparak, daha sonra deneysel olarak hayvanlarda hastalık oluşturarak ve enfekte ettiği hayvanlardan bakteriyi yeniden üreterek " Koch Postulası" nı beyan etmiştir [13]. Fransız araştırmacıları Albert Calmette ve Camille Guerin 1921 yılında sığır TB basilini 230 kez pasaj yaparak ilk TB aşısı Bacillus Calmette-Guerin (BCG)'i geliştirmişlerdir [14].

TB tedavisinde yeni bir dönem 1940'lı yıllarda para-aminosalisilik asit (PAS) ve streptomisin bulunmasıyla başlamıştır. 1952 yılında izoniazidin (INH), 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962'de etambutol (EMB), daha sonra 1966'da rifampisin (RIF) bulunması ve uygulanması sonucunda TB tedavi edilebilir bir hastalık olmuştur [15].

TDM'ler ilk defa 1950 yıllarında TB tedavisine cevap vermeyen TB hastalarının %1-2'sinde insan patojeni olarak tanımlanmıştır. 1868 yılında İngiltere'de tavuklarda insan TB'sini taklit eden bir vaka görülmüştür. 1890 yılında izole edilerek TB'den farklı bir tür olduğu tanımlanan bu bakteri türü sonradan *M. avium* olarak adlandırılmıştır. 1943 yılında bir olguda silikozis tanısı olan hastanın altta yatan enfeksiyon nedeni *M. avium* kompleks (MAC) olduğu tespit edilmiştir [16].

## 2.2 . Mikobakterilerin genel özellikleri

*Mycobacterium* cinsi *Mycobacteriaceae* ailesinin tek üyesidir. Hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, çomaklar halinde, aside dirençli ve aerobik özelliğe sahip bakteridir. Standart hücre duvarı yapısına sahip olmadıklarından Gram pozitif veya negatif olarak değerlendirilemezler. Hücre duvarlarında yaygın lipid molekülleri vardır (Şekil 1.1). Lipidler mikrobakteriyi hem dış etkenlerden korur hem de standart boyalarla boyama mümkünlüğüne sebep olur. Özel ayırt edici boyalarla (Ziehl- Neelsen, Kinyoun, floresan) boyanabilirler [17]. Genellikle hücre içi yerleşim gösterip, hücrel immün cevap verir ve geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu granülatöz tipte infeksiyonlara neden olurlar [18]. Mikobakteriler dokuda 0.3-0.6 µm eninde, 1.0-10 µm boyutunda bulunan ince basillerdir. Bölünme süreleri 12-18 saat olup geç çoğalan, plemorfik çomaklardır. Optimum üreme şartları pH 5-6 ve %5-10 CO<sub>2</sub>'dir. 37°C sıcaklıkta üremesine karşın bu sıcaklık türe göre değişmektedir (Tablo 2.1). Koloniler 10-15 günde gözle görünmeye başlar. MTB ve *M. bovis* 2 haftadan daha uzun sürede, *M. avium* ve *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. marnium* 1 haftadan daha uzun sürede, *M. fortuitum*, *M. chelonae* türleri ise bir haftadan daha az bir sürede üreme gösterebilirler [19].

Mikobakterilerde guanin ve sitozin (G+C) (%62-70) oranı yüksektir. Farklı mikroorganizmalarda ; *Nocardia* (%60-69) , *Rhodococcus* (%59-69) ve *Corynebacterium*' larda (%51-59) bu oran yüksek olup mikobakterilerle hemen hemen aynıdır. Yapılan çalışmalar MTB, *M. bovis* ve *M. lepra* türlerinin genetik tiplendirilmesinden sonra hızlanmıştır. Mikroorganizmanın doğal biyokimyasal antijenik ve genetik verileriyle ilgili teorik bilgileri daha da netleşmiştir. Mikobakterilerin genomunun *B. subtilis* ve *E. coli* gibi kolay ve hızlı çoğalan mikroorganizmalara nazaran boyutu küçük olduğu tespit edilmiştir. MTB H37Rv suşunun gen boyutu 4.411.529 bp olup tahmini 3.986 proteini kodlamaktadır [20].

**Tablo 2.1.** Mikobakterilerin genel özellikler

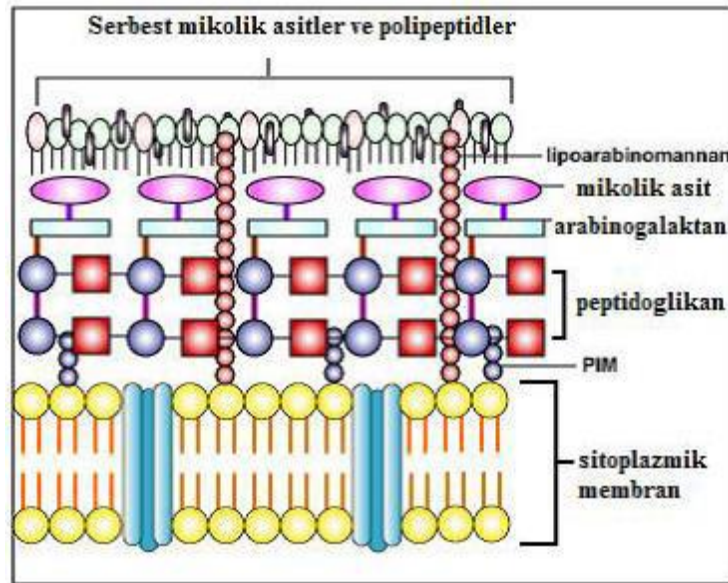
Türler	Mikobakterilerin Genel Özellikleri																		
	Üreme Dereceleri <sup>a</sup> °C				Koloni		Niacin	T <sub>2</sub> H' ya Duyarlılık	Nitrat Redüksiyonu	Yarı Kantitatif Katalaz	68°C Katalaz	Tween Hidrolizi	Tellürit Redüksiyonu	%5 NaCl' ye dienç	Demir Alımı	Aryl Sulfataz	MacConkey agarda üreme	Üreaz	Pirazinamidase
	45	37	31	24	Tipi <sup>b</sup>	Pigment <sup>c</sup>													
<i>M.tuberculosis</i>	-	Y <sup>1</sup>	Y	-	R <sup>1</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	+	+
<i>M.bovis</i>	-	Y		-	R	-	-	+	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	+	-
<i>M.kansasii</i>		Y	Y	Y	S/R <sup>2</sup>	F <sup>1</sup>	-	-	+	+	+	+	-/+	-	-	-	-	+	-
<i>M.marinum</i>		-/+	O <sup>2</sup>	O	S/R	F	-/+	-	-	-	-	+	-/+	-	-	-/+	-	+	-
<i>M.ulcerans</i>	-	-	Y	-	R	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M.simiae</i>		Y			S	F	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>M.scrofulaceum</i>		Y	Y	Y	S	Sk <sup>2</sup>	-	-	-	+	+	-	-/+	-	-	D	-	+	+
<i>M.szulgai</i>		Y	Y	Y	S/R	Sk/F	-	-	+	+	+	-/+	-/+	-	-	D	-	+	+
<i>M.gordonae</i>		Y	Y	Y	S	Sk	-	-	-	+	+	+	-	-	-	D	-	-	-/+
<i>M.xenopi</i>	Y	Y			S	Sk	-	-	-	-	+	-	-/+	-	-	+	-	-	D
<i>M.avium-intracellulae</i>	-/+	Y		-/+	S/R	-	-	-	-	-	-/+	-	+	-	-	-	-	-/+	+
<i>M.gastri</i>		Y		Y	S/R	-	-	-	-	-	-	+	-/+	-	-	-	-	+	-
<i>M.mamoense</i>		Y	Y	Y	S	-	-	-	-	-	+/-	+	+	-	-	-	-	D	+
<i>M.haemophilum</i>			Y	Y	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M.nonchromogenicum</i>		Y		Y	S/R	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	D	-	D
<i>M.terrae</i>		Y		Y	S/R	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	D	-	D
<i>M.triviale</i>		O		Y	R	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-/+	-	-	D
<i>M.fortuitum</i>	-	Ç <sup>3</sup>		Ç	S/R	-	-	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
<i>M.chelonae</i>		Ç		Ç	S/R	-	D	-	-	+	D	D	+	D	-	+	+	+	+

<b>M.phlei</b>	Ç	Ç		Ç	R	Sk				+	+	+	+	+	+	+	-	-		
<b>M.smegmatis</b>	Ç	Ç		Ç	S/R	-				+	+	+	+	+	+	+	-	-		
<b>M.vaccae</b>		Ç		Ç	S	Sk				+	+	+	+	+	D	+	-	-		

**Açıklamalar:** a-1 Y: bulunduğu sıcaklık derecesinde yavaş üreyenler, 2 0: bulunduğu sıcaklık derecesinde orta hızda üreyenler, 3 Ç: bulunduğu sıcaklık derecesinde çabuk üreyenler. b-1 S: smooth-düz koloni, 2S/R: smooth-düz rough-düzensiz oluşturanlar. c-1 f: fotokromojenler, 2 Sk skotokromojenler. + olumlu, - olumsuz, +- genellikle olumlu, -+ genellikle olumsuz, D: değişken.

### 2.3. Mikobakterilerin hücre duvarı

Mikobakterilerin hücre yapısı diğer bakterilerin hücre yapısı ile benzerlik gösterir. Lipid bakımından zengin olmasından dolayı karmaşık bir hücre duvar yapısına sahiptir (Şekil 2.1). Dış membrana sahip değiller, iç membranları ise kalın peptidoglikan tabaka ile örülüdür. Plazma membranında lipoarabinomannan (LAM), proteinler ve fosfatidil inositol mannosidler mevcuttur. LAM, mikobakterilerde işlevsel olarak O antijeni ile aynıdır. Peptidoglikan tabakasının üstünde D-arabinoz ve D-galaktoz'dan oluşan dallanmış arabinogalaktan polisakariti vardır. Hidrofobik özelliğe sahip olan hücre duvarı elemanlarının üçte ikisini lipidler oluşturur. Hücre duvar katmanları boyunca transport proteinleri ve belirsiz yerlerde porinler saptanabilir [21].



Şekil 2.1. Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı

MAC üyelerinin hücre duvarında mevcut olan kord faktörü diğer adıyla trehaloz-6-6-dimikolat mikroorganizmanın virulans faktörlerindedir. Kültür preparatlarında mikobakterilerin demet şeklinde görülmesinde ve sıvı besiyerinde uzun yılankavi şekiller oluşturmasında kord faktörü rol oynar. Mikobakterinin konak hücrede canlı kalmasından ise sulfatid (trehaloz 2 sulfat) sorumludur. Virulans faktör ile bir birilerini aktive ederek, sinerji sağlayarak çalışırlar. Diğer bir grup proetinler, ısı şok proteinlerinin (65Kda, 38Kda, 12Kda) dayanıklılığın sürdürülebilmesinde etkili olduğu ihtimal edilmektedir. TDM'lerde trehaloz-6-6-dimikolat maddesi görülmez[2,21].

#### 2.4. Mikobakterilerin sınıflandırılması

Mikobakteri türlerinin sınıflandırılmasında ayrı araştırmacılar tarafından farklı metodlar kullanılmıştır. 1950'li yıllarda Ernest Runyon TB ve *M. bovis* dışındaki mikobakterileri koloni morfolojileri, pigment oluşturmalarını, üreme sürelerini temel alarak; nonkromojenler, fotokromojenler, skotokromojenler ve hızlı üreyenler olarak 4 grupta sınıflandırmıştır (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2.** Tüberküloz dışı mikobakterilerde Runyon Sınıflandırılması

I	Fotokromojenler	Yavaş üreme	Sarı-portakal reng pigment oluşumu	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>
II	Skotokromojenler	Yavaş üreme	Sarı-portakal reng pigment oluşumu	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. szulgai</i>
III	Nonkromojenler	Yavaş üreme	Yok	<i>M. avium - intracellulare</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. terrae</i> <i>M. malmoense</i>

				<i>M. ulcerans</i>
IV	Hızlı Üreyenler	Hızlı üreme (Kültürde 7 Gün içinde saptanabilir)	Yok	<i>M. fortuitum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i>

Runyon sınıflandırması sonraki dönemlerde bazı türlerin klinik olarak anlamlı olması sebebiyle sınıflandırmada bazı sorunlar ortaya çıkmıştır. Örneğin, *M. kansasii*'nin hangi grupta yer alacağı net değildir. Runyon'un sınıflandırmasındaki kısıtlamalarına rağmen, TDM'lerin ön tanısında bu sınıflandırmadan kullanılmaktadır. [22].

***Mycobacterium marinum*** : Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına en sık sebep olan etkenlerden biridir. Mikrobiyolojik özellikleri arasında fotokromojenik kolonilerle 7 ile 14 gün içinde büyümesi ve *M. ülserans* ve diğer mikoleakton üreten TDM'den moleküler temelde ayırt edilmesinin zor olması gerçeği yer alır [23]. Balıklar ve su ile ilişkili olan bu tür özellikle körfez, liman ve kıyı suları gibi ılık, tuzlu sularda bulunmaktadır. İnsanlara bulaş, bütünlüğü bozulmuş cildin kontamine su veya deniz ürünleri ile temas etmesi sonucunda olmaktadır [24]. İnsandan insana bulaş henüz belirtilmemiştir. Epidemiler kontamine olmuş klorsuz aynı yüzme havuzunu kullanan kişiler arasında görülmektedir. Kontamine olmuş deri bölgesinde kahverengi lezyonlar (tipik olarak sporotrikoid veya subakut el nodülleri) ve sıklıkla kortikosteroidlerin lokal kullanımı ile ilişkili olan eklem ve kemiğe yayılan lezyonları gözlenmektedir [25]. Kültürde Middlebrook 7H10, 7H11 ve antibiyotikli Lowenstein -Jensen besiyerleri kullanılır. 7-10 gün içinde üremiş koloniler koyu renkli pigmente olmayan koloniler şeklindedir. Bunu takiben ise 24-48 saat içinde sarı renkte pigmentoz koloniler gözlenebilir [26]. Genellikle tedavi birkaç ay boyunca antibiyotik kullanımı ve cerrahi ile kullanımı ile yapılmaktadır. Önerilen antibiyotikler: minosiklin (2x100mg), doksisisiklin (2x100mg), rifampisin (600mg/gün), trimetoprim sulfametoksazole (2x160/800mg), klotrimisin (2x500mg) ve siprofloksasindir [27].

***Mycobacterium kansasii*** : En sık iyi klorlanmamış musluk sularında, öküz ve domuz gibi hayvanlarda bulunmaktadır. Tipik olarak bireyin solunum örneklerinden elde edilen kültürlerinde etken olarak bulunur. Klasik akciğer hastalıklarına neden olmakla beraber cilt enfeksiyonları ve artrit, menenjit, lenfadenit, osteomyelitle de kliniğe başvuran hastalar da görülmektedir. HIV kişilerde solunum sistemi ve multi organ tutulumu şeklindeki ko-enfeksiyonu olarak karşımıza çıkabilir [28]. Cilt enfeksiyonları özellikle immünsuprese hastalarda normal veya bütünlüğü bozulmuş cilt dokusunda gelişmektedir. *M. kansasii*'nin 15 günlük inkübasyon dönemini takiben gözlenen cilt lezyonları kırmızı renkli papül ve ya plaklar ; püstüler, ülser, kabuklu veya verrüköz papül veya nodüller ; sellülit ve apse tabloları şeklinde gözlenebilir. Lezyonların histopatolojik incelenmesinde akut ve kronik inflamasyon bulgularının yanı sıra tuberküloid ve ya epiteloid granülomlar mevcuttur. *M. kansasii* Lowenstein-Jensen besiyerinde 37'C'de en az 10-20 gün inkübasyonu sonucunda sarı portakal renkli beta karoten kristalleri pigmentler gözlenebilir [29,30]. Tedavide Rifampin (600 mg/gün), isoniazid (300 mg/gün) ve etambutol (başlangıçta 25 mg/ gün iki ay ve devamında 15 mg/gün) tedavisi genellikle balgam negatifleştikten sonra 12 ay olmak üzere 18 ay devam edilir [31].

***Mycobacterium szulgai*** : Nadir görülen bir türdür. Atipik mikobakteriyel enfeksiyonların % 1'den az bölümüne sahiptir. Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep olmaktadır. Ciltte oluşan lezyonlar ekstremitelerde ve gövdede kırmızı hassas nodüller şeklinde olup spontan olarak drene olabilirler. Bu lezyonlar ilerleyerek subkutan ve kemik dokuyu enfekte edebilirler. Kültürleri diğer mikobakterilere benzemektedir. Tedavide INH (300 mg/gün), RIF (600 mg/gün) ve EMB (1.200 mg/gün) uzun süreli kullanılmalıdır [32,33].

***Mycobacterium scrofulaceum*** : *M. scrofulaceum* enfeksiyonu pediatrik servikal lenfadenit vakalarında tanımlanmıştır, ancak yetişkinlerde de görülebilmektedir. Özellikle çocukluk çağında yol açtığı servikal lenfadenopati sebebiyle "scrofulaceum" olarak isimlendirilmiştir. Doğada toprakta, musluk sularında, çiğ sütte ve birçok süt ürünlerinde bulunabilmektedir. İnsanlara bulaş açısından oral, orofarengeal ve hematogen yayılımın etkili olduğu düşünülmektedir. *M. scrofulaceum* enfeksiyonu erişkinlerde tek taraflı hassas servikal lenfadenopatiye sebep olmaktadır. Bu lenf nodu kendiliğinden drene olabilmekle beraber multipl dağınık paternde subkütanoz apseler de seyredilmektedir. Cilt tutulumunun yanı sıra pulmoner tutulu dissemine hastalık tablosu, konjunktivit, menenjit, granülamatoz hepatit ve osteomyelit tablosu gözlenebilir [33]. Anormal lenf düğümlerinin cerrahi eksizyonu, çok düşük bir nüks oranıyla ilişkili etkili bir tedavidir. İnsizyon ve drenaj yoluyla lenf düğümlerinin çıkarılması durumunda enfeksiyon genellikle devam eder. Sinüs yolu oluşumuna neden olabilir ve cerrahi gerekebilir. Tedavide gecikme, sinüs yollarının ve yara izlerinin gelişme şansını

artırarak kalıcı bir kozmetik kusura yol açar. Tedavide cerrahi olarak lenf nodunun çıkarılması ile birlikte , tedavi süresi 9 ay olarak RIF ve INH kombinasyonu kullanılmalıdır [34].

***Mycobacterium avium- intracellulare kompleks (MAC)*** : MAC enfeksiyonlarından sorumlu bakteriler : *M. avium* ve *M. intracellulare*'dir. Bu bakteriler toprakta, tuzlu ve temiz suda, hayvan yemlerinde, bazı bitkiler dahil birçok yerlerde bulunabilmektedir [35,36]. Sağlıklı kişilerde bulunan MAC her hangi bir enfeksiyon etkeni değil iken, bağışıklığı düşük hastalarda özellikle AIDS hastalarında önemli bir solunum yolu enfeksiyonu etkenidir. Bu hasta grubunda cilt lezyonları daha sık gözlenmektedir. Bu lezyonlar başlangıçta kırmızı renkli plaklar şeklinde veya ülseratif lezyonlar şeklindedir ve disseminasyon sonucunda granülomlar, ülserler, püstüller ve yaygın lenfadenopati tabloları gelişebilir [37]. Tedavide önerilen rejim özellikle makrolid antibiotiklerin eklendiği kombinasyon tedavileridir. Bu kombinasyonda klatromisin, rifampisin ve etambutol yanı sıra steptomisin de kullanılabilir [29].

***Mycobacterium ulcerans: Ülserans*** ile enfeksiyonun neden olduğu hastalığın ismi coğrafi bölgeye göre Buruli ülseri, Kakerifu ülseri, Bairsdale ülseri Searls' ülseri ve ya Kumusi ülseri olarak isimlendirilmiştir. Özellikle Uganda ve Zaire gibi tropikal ve subtropikal bölgelerde sıklıkla gözlenmektedir. Enfeksiyonun kirli su, toprak veya bitki örtüsü ile temastan sonra aşınmış deri veya hafif travmatik yaralanmalar yoluyla bulaştığı bilinmektedir. Lezyonlar özellikle ekstremitelerde karşımıza çıkmakla beraber küçük eritematöz lezyonlardan başlayarak ilerleyici nekrotik ve ülseratif lezyonlara da dönüşebilmektedir. Özellikle immünsupressif hasta grubunda bu lezyonlara yol açabileceği unutulmamalıdır. Tedavide klaritromisin ile rifampisin kombinasyonunun kullanılması önerilmekle beraber son yıllarda yapılan çalışmalarda bir kinolon olan siprofloksasinin de rifampisin ile kombinasyonunun oldukça başarılı olabileceği gösterilmiştir [38,39].

***Mycobacterium xenopi***: *M. xenopi* 42-45° C'de optimum büyüme ile yavaş büyüyen bir termofil mikobakteridir. İlk olarak Schwabacher tarafından 1959 yılında Afrika kurbağası olan 'Xenopus laevis' in deri lezyolarından izole edilmiştir. Birçok ülkede sıcak su hatlarından ve doğal su kaynaklarından izole edilmiştir. Bulaşın çevreden aerosollerin inhalasyonu veya sindirimi ile olduğu düşünülmele birlikte insandan insana bulaş kanıtlanamamıştır. *M. xenopi* , Kanada, Birleşik Krallık ve Avrupa'nın belirli bölgelerinde NTM akciğer hastalığının bir nedeni olarak MAC'dan sonra ikinci sıradadır. Neden olduğu akciğer enfeksiyonu genellikle kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan kişilerde gelişir. Eklem ve yumuşak doku enfeksiyonlu ekstrapulmoner vakalar da gözlenmiştir. Optimal tedavi rejimi klaritromisin veya azitromisin, EMB ve RIF içerir [40,41].

***Mycobacterium gordonae***: Eskiden *M. aquae* olarak adlandırılan *M. gordonae* ,yavaş büyüyen mikobakteridir. *M. gordonae* en az patojenik türdür ve kontaminant mikroorganizma

olarak kabul edilir. Her yerde bulunan bu mikroorganizma yaygın olarak toprak ve sudan izole edilmektedir. Tıbbi aletlerin durulanması için kullanılan musluk suyu ve bronkoskopiye kullanılan topikal anesteziye eklenen boya nedeniyle hastanede bulaştığı bildirilmektedir [4,42]. Cilt enfeksiyonları hassas ve boyutu 0.5-1.5 cm arasında değişebilen papülonodüler lezyonlar şeklindedir ve bu lezyonların yüzeyi ülseratif hal alabilir. Histopatolojik olarak ise geniş histiositler, multinükleuslu dev hücreler, akut ve kronik inflamasyon bulguları tespit edilebilir. En iyi üreme ısı 37°C olup, yaklaşık 4-8 hafta gibi uzun sürede üremektedir. Koloniler sarıportakal rengindedir. Kültür için pH'sı 6 olan Ogawa besiyeri kullanılmaktadır. Tedavide oral RIF'in (300 mg/gün) 6 ay süre ile veya TMP-SMX (2x320 mg/1600 mg) ile EMB (800 mg/gün) kombinasyonunun 24 ay süre ile kullanılması önerilmektedir [43,44].

***Mycobacterium haemophilum*** : *M. haemophilum* ilk kez 1978'de immün sistemi baskılanmış hastalarda deri enfeksiyonlarına neden olan bir patojen olarak tanımlanmıştır. Mikroorganizmanın, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda deri ve deri altı enfeksiyonlarına, septik artrit, osteomyelit ve pnömöniye neden olduğu da bilinmektedir. Servikofasiyal lenfadenit, immünokompetan çocuklarda en sık görülen bulgudur . Optimal üreme sıcaklığı 30° C 'dir [45]. Cilt lezyonları kırmızı parlak renkli papüller şeklinde ortaya çıkar, bundan sonra ilerleyerek hassas ülser nodul veya abse şekline dönebilmektedir. Histopatolojik olarak polimorfonükleer infiltrat ile beraber granülamatöz pannikülit tablosu gözlenirken, Langhan's tipi dev hücreler ve non kazeifiye nekroz da belirlenebilir. Kültürde üremesi için hemoglobin veya hemin , koyun kanlı agar veya %2 ferrik amonyumsitratlı Lowenstein-Jensen besiyerleri gerektirmektedir. 2-4 hafta içinde 21 non pigmente koloniler gözlemlenir. Tedavide INH ve RIF kombinasyonu kullanılmaktadır [46].

***Mycobacterium fortuitum* ve *Mycobacterium chelonae***: *M. fortuitum* ve *M. chelonae*, *mycobacterium* cinsinin farklı türleri olmasına rağmen, hem kültür özelliklerinin benzer olması hem de oluşturduğu klinik tabloların benzer olması sebebi ile eskiden aynı grupta sınıflandırılmıştır [47]. Bu ikili TDM'lerin hızlı çoğalan grubuna aittir ve doğal dış ortamlarda sık bulunur. Kısa bir zaman diliminde ve hızlı çoğalma becerileri nedeniyle çevreden bulaşabileceği gibi, hastane kaynaklı nedenlerle de olabilir. Örneğin, kişisel hijyen kurallarının bozulması veya kontamine solüsyonlar, yapay ürünlerin dekontamine olması (prostetik kapak), tıbbi cihaz veya aletlerin uygunsuz kullanımı, cerrahi sterilitenin bozulması ve ya işlem sırasında yapılan standart dışı prosedürler sırasında da bulaşabilir. Bu mikobakteriler kistik fibrozis ve bronşektazi gibi solunumsal kronik hastalıklarda edinsel pulmoner enfeksiyonlar için, travma ve cerrahi işlemler sonrasında yumuşak doku ve deri enfeksiyonları için risk faktörleri olarak gösterilebilir. 3-4 haftalık bir inkübasyonu takiben soğuk abseler ve drenaj gözlemlenebilir. Bazı durumlarda travmaya uğramış veya cerrahi uygulanan bölgedeki enfeksiyonun disseminasyonu

sonucunda kırmızı kahverenkli hassas olmayan subkutan nodüler lezyonlar oluşabilir. Aynı zamanda drene olabilen soliter lenf nodları, postoperatif endokardit, osteomyelit ve kronik pulmoner hastalık tabloları da gözlenebilmektedir. Histopatolojik olarak granülamatoz inflamasyon, nekroz ve dev hücreler gözlenebilir [48]. *M. fortuitum-chelonae* kompleks de grubun diğer üyeleri gibi klasik referans tedaviye dirençlidirler. Bu mikroorganizmalar, amikasin, siprofloksasin, azitromisin, imipenem, klaritromisin, doksisisiklin ve sülfonamidlere duyarlıdır [47].

***Mycobacterium smegmatis*:** İlk kez *M. smegmatis* 1884 yılında Lustgarten tarafından izole edilmiştir. Yaygın olarak toprakta, suda ve bitkilerde bulunmaktadır. Herhangi bir memelide sürekli olarak kalmaz ve bulaşıcı hastalık veya enfeksiyonlara neden olmaz [49]. Bu mikroorganizmaya bağlı gelişen cilt enfeksiyonları ilk olarak kardiyak cerrahiye takiben tanımlanmıştır. Bu organizma için en sık risk faktörleri olarak cerrahi, travma veya diğer invaziv prosedürler kabul edilmektedir. Sellülit, yara etrafında drene olabilen hiperemik apse lezyonları en sık karşılaşılan cilt enfeksiyonu tablolarıdır. Middlebrook 7H10 agar besiyerinde, 43-45 °C' de 7 günden daha kısa süre içinde üremektedir [50]. Tedavide doksisisiklin, trimetoprim-sulfametoksazol, siprofloksasin ve amikasin kombinasyonuna çok iyi yanıt vermektedir. TDM türlerine bağlı gelişen cilt enfeksiyonları özellikle son yıllarda immünsupressif hasta grubundaki artışa paralel olarak daha sık gözlenmeye başlamıştır [51].

## 2.5. Tüberkülozun tanısı

Tüberküloz tanısı klinik, histopatolojik, immünolojik ve mikrobiyolojik olarak konulmaktadır. Kesin tanı için klinik örneklerde TB basilinin mikrobiyolojik olarak incelenmesi gerekmektedir. Mikrobiyolojik tanıda kullanılan yöntemlere mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler testler aittir. Kültürde basillerin görülmesi için 2-3 haftalık bir süre beklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle mikroskop ile saptanması büyük önem taşır [2].

**Mikroskopi:** Organ tutulumuna göre laboratuvar incelemelerinde: balgam, mide lavajı, bronşiyal lavaj, laringeal sürüntü, beyin omurilik sıvısı (BOS), plevra sıvısı, idrar, gaita, cilt ve yumuşak doku biyopsi örnekleri gibi çok çeşitli klinik örnek kullanılabilir. Klinik örnekler; organik kalıntıları sindirip homojenize etmek için homojenizasyon ve kontaminasyona neden olabilecek mikroorganizmaları (bakteri, mantar vb.) ortamdaki uzaklaştırmak için dekontaminasyon işlemi uygulanmaktadır. Mikobakteri basili balgamdan yapılan yaymada kolaylıkla direkt saptanabilir. Basilin saptanabilmesi için balgamın her ml'sinde en az 5000-10000 basil olmalıdır. Ön tanıda Pulmoner TB düşünülen hastada, 3 gün

art arda sabah balgamından alınan örneğin değerlendirilmesi ile doğru tanı kesinleşebilir [52].

Direkt yayma preparatların incelenmesinde yağın kullanılan boyama yöntemleri Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) ve Auramin-rodamine'dir. Türkiyede kullanılan en sık boyama yöntemi EZN boyamadır. Bu yöntemde metilen mavisi ile eklendiğinde aside dirençli basiller mavi fonda pembe-kırmızı ince çomaklar şeklinde görülebilmektedir. Mikroskopik incelemede bütün alanlar özenle ve en az 300 mikroskop alanını dahil edilecek şekilde (en az 15 dk) gözden geçirilmelidir. Basilin sayısının alan oranına göre materyelin pozitifliği sonçlanır (Tablo 3.1). *Nocardia* türleri, *Legionella micdadei*, *Rhodococcus aurantiaca*, *Echinococcus granulosus* gibi diğer mikroorganizmalar da aside dirençli boyandıklarından, materyelde basilin görülmesi kesin tanı için yeterli değildir [53.54].

**Tablo 2.3.** Direkt boyalı preparatların değerlendirilmesi

RAPOR	Görülen ARB sayısı		
	Fuksin boya	Florokrom boya	
	1000 X	250 X	450 X
Negatif	0	0	0
Şüpheli,tekrar	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

Auramin-rodamin boyama yöntemi ile boyanan mikroorganizmalar sarı-turuncu renkte floresan verirler. Auramin-rodamin boyama yönteminin EZN boyama yönteminden daha hassas olduğu ve kısa zamanda geniş bir tarama imkanı verdiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Aynı kişiden alınmış farklı örneklerden hazırlanan preparatların biri pozitif saptanırken diğeri negatif saptanabilir. Bazen ARB pozitif olsa da , kültürde üreme olmayabilir. Bu durum yeni vakaların görülmesi, tedaviye yanıt, ilaca direnç ve ilaç değişikliği gibi konularda önem göstermektedir. Örneğin, tedavi altında olan bir hastada mikobakteri miktarında azalma yoksa veya ARB hala negatifleşmemişse ilaç direnci düşünülmelidir. Auramin-rodamine ile

değerlendirme floresan mikroskopta yapıldığı için bu mikroskobu temin edemeyen laboratuvarlar için DSÖ tarafından EZN yöntemi önerilmektedir. Bu nedenden dolayı birçok ülkede rutin olarak EZN yöntemi kullanılmaktadır[54].

**Kültür:** Kültür yöntemleri mikobakterilerin tansında altın standart yöntemdir. Katı ve sıvı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Katı besiyerinin agar ve yumurta bazlı iki çeşidi vardır. Yumurta bazlı besiyerleri : Lowensterin- Jensen (LJ), petragnani besiyeri, American Thoracic Society, agar bazlı besiyerlerine Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 besiyeri aittir. Middlebrook 7H9 ise sıvı besiyeri olarak ise kullanılmaktadır. Bu besiyerlerinin en önemli avantajı mikobakterlerin birçoğunun üretilmesinin mümkün olmasıdır. Mikobakterilerin besiyerinden izole edilmeleri için kültürlerin uzun süre inkübe edilmesi gerekmektedir. Kültür süreleri ise katı besiyerinde 35–37°C’ de 6–8 hafta kadardır. Günümüzde en sık kullanılan katı besiyeri, Lowensterin-Jensen (LJ)’dir. İçeriğinde patates unu, gliserol, tuz, yumurta bulunmasıyla kontaminasyonu engellerken aynı zamanda TB için uygun üreme şartlarını sağlar. Bu besiyerinin avantajları, içerdiği malaşit yeşili kontaminan mikroorganizmaların üremesini engellemesi, ucuz olması ve birçok mikobakteri türünü üretebilme özelliği olarak sıralanmaktadır [55].

Yoğun kontamine örneklerde mikobakteri izolasyonunda özellikle petragnani besiyeri kullanılmaktadır. Çünkü inhibitör madde olarak besiyerine eklenen malaşit yeşilini daha yüksek konsantrasyonda içermektedir [56].

BOS, plevra sıvısı, biyopsi gibi steril örneklerin kültüründe, özellikle American Thoracic Society Medium (ATSM), düşük oranda malaşit yeşili içerdiğinden tercih edilmektedir. Yumurtalı besiyerlerinin gelişmekte olan ülkeler ve Avrupa’da daha çok tercih edildiği, agarlı besiyerlerinin (Middlebrook) ABD’de kullanıldığı bildirilmiştir [57].

Agar bazlı Middlebrook 7H10 ve 7H11 besiyerleri ilk kez Middlebrook ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir [58]. Bu besiyerlerinin agar bazına, gliserol ve OADC (Oleik asit/Albümin/Dekstroz/Katalaz) eklenmek suretiyle kullanılmaktadır. Besiyeri hazırlandıktan sonra en fazla 3 hafta süre içerisinde kullanılmak zorundadır [59]. Middlebrook 7H11 besiyerinin LJ besiyerine göre bir çok avantajları vardır. Bunlara kolonilerin kısa zamanda görülmesi, anti-TB ilaçlardan etkilenmemesi, INH dirençli bakterilerin kolayca çoğalması söylenebilir. Bu besiyerinin içeriğine %0.1’lik enzimatik kazein hidrolizat’ın ilave edilmesi *M. tuberculosis* saptanmasını artırır. Ayrıca % 2 gliserol içermekte olup bu sayede *M. avium* kompleksi bu besiyerinde daha kolay üremektedir [59,60].

Dubos tween albumin ve Middlebrook 7H9 (sıvı besiyeri), 7H12, 7H13 besiyerleri, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, in vitro ve diğer duyarlık

deneylerde tercih edilmektedir. Sıvı besiyerleri hem subkültürlerinin yapılması, hem de mikobakterilerin primer izolasyonu için kullanılmaktadır [61]. Üreme genellikle kompleks besiyerlerine göre daha hızlıdır [62]. Günümüzde klinik ve referans laboratuvarında kullanılan tam ve yarı otomatize kültür sistemlerinin çok sayıda ticari kitleri vardır [63].

**BACTEC 460TB Sistem:** Otomatize BACTEC 460 cihazı iğne aspirasyon düzeneği içerir ve her bir kültür şişesi bu düzeneğin altından her 80 saniye aralıklarla hizalanmış olarak geçer. Kültür şişesinin üst kısmındaki gazdan bir örnek aspire edilir ve bir sintilasyon sayaç bölmesine gönderilir. Örnek aspire edildikten sonra, %10'luk CO<sub>2</sub> ile yer değiştirir. Bactec 12 B broth kültür şişesi, Middlebrook 7H9, sığır serum albumini (BSA), kazein hidrolizat, katalaz, büyüme artırıcı olarak polioksietilen stearat ve büyümeyi izlemek amaçlı C<sup>14</sup> işaretli palmitik asit vardır. Kontaminasyonu engellemek için PANTA (Polimiksin B, amfotersin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin) antimikrobiyal karışımından eklenmiş 4ml sıvı kültür ortamı içerir. Bu şişelere 0.5 ml işlenmiş örnek inoküle edilir ve 35°C' de inkübatöre konulur. Besiyerinde karbon kaynağı olarak bulunan C<sup>14</sup> ile işaretli palmitik asit, inokulum içinde mikobakteriler varsa CO<sub>2</sub><sup>14</sup> ye metabolize edilir ve BACTEC 460 cihazındaki radyoaktif detektör sistemi bunu ölçer [64]. Radyoaktivite miktarı growth indeks (GI) olarak isimlendirilen sayısal bir değere göre ayrt edilmektedir. GI 10'dan yüksek ise pozitif olarak kabul edilir. TB için ortalama üreme süresi 9-14 gün iken TDM için ise 7 günden daha kısadır. Günümüzde BACTEC 460 cihazı TB'nin hızlı tespitinde geliştirilen sıvı bazlı sistemlerin en iyisidir[61].

**MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube):** Plastik yapıdaki kültür tüplerinde modifiye Middlebrook 7H11'e ilaveten 0.5 ml OADC ile zenginleştirilmiş ve 0.1 ml PANTA (Polimiksin B, amfotersin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin) antibiyotik karışımı da içeren sıvı bazlı radyometrik olmayan tam otomatize bir sistemdir. Bu sisteme basillerin üremesini tespit etmek için oksijen tüketimine bağlı floresans sensörü (rutenyum pentahidrate emdirilmiş sikon plastik) dahildir. Besiyeride mikobakteri üremesi ile oksijen kullanılır ve tüpler 365 nm'de ultraviyole ışıkla aydınlatıldığı zaman gösterge parlak ışık yansımaları verir. Klinik değerlendirme katı besiyerinden üstündür ve MGIT sisteminin duyarlılığı, üremeyi saptama süresi BACTEC 460TB sisteminde olduğu gibidir. MGIT kontaminasyon oranları günümüzde BACTEC 460TB sisteminden daha yüksektir. Primer ilaç duyarlılık testlerinde, MGIT'in hem manuel hem de otomatize versiyonu BACTEC 460 TB sisteminin yerine geçebilecek eşdeğerdedir [61].

**Versa TREK (ESP Kültür Sistemi II):** ESP (Elektronik Stabilité Programı) kan kültür sisteminin bir uyarlamasıdır. Her bir kültür şişesi, inkübasyon modülünde özel bir çekmeceye yerleştirildiğinde, bir plastik gövde, gömülü bir iğne ve bir hidrofobik zardan oluşan bir sensöre bağlanmış olur ve mikroorganizmaların metabolik aktivitelerine bağlı her hangi bir gaz basınç

değişikliği açısından sürekli izlenirler [64]. Versa TREK sistemi üretilen veya tüketilen gaz ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $N_2$ ,  $H_2$ ) ne olursa olsun şişenin üst kısmındaki basınç değişikliklerini algılar [65].

Şişeler modifiye Middlebrook 7H9 medium, gliserol ve selüloz süngerler içerir. Bu süngerler akciğer alveollerini taklit ederek, mikobakteriler için büyüme platformu sağlarlar. İnokülasyondan hemen önce her şişeye polimiksin B, vankomisin, nalidiksik asit ve amfoterisin B içeren bir antibiyotik kombinasyonu eklenir (PVNA) [61].

Bazı çalışmalarda muhtemel büyüme döngüsünün oksijen tüketim açamasında elde edilen erken sinyale dayalı olarak ESP MYCO sistem BACTEC 460 sistemine göre kültürlerin yaklaşık yarısını 7 gün daha erken tespit etmesi gösterilmiştir [64].

### 2.5.1. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin tanısı

TDM'ler, hem doğal hem de işlenmiş su kaynaklarında, toprakta yaygın olarak görülmektedir. Bu nedenle hasta örnekleri alınırken özellikle şehir şebeke suyu ve çevresel kontaminasyondan kaçınılmalıdır. Hastalıktan şüphe edilen kişide etken olarak TDM ya da MTBC varolduğunu klinik olarak tespit etmek imkansızdır. Bu nedenle her olgu ayrı ayrılıkta değerlendirildiğinde, biyopsi ve laboratuvar incelemesi için lokalizasyona göre örnekler; balgam, BOS, vücut sıvıları, abse, AMS, idrar, dışkı alınabilir [7].

**Mikroskopi:** Mikobakteri enfeksiyonlarının kesin tanısı amacıyla preparatda ARB pozitifliği ve eşzamanlı kültürünün yapılması çok önemlidir. Bu yaklaşım laboratuvar sonuçları doğrultusunda bireye planlanacak tedavi ve izlem açısından altın standarttır. Klinik örneklere; organik kalıntıları sindirip homojenize etmek için homojenizasyon ve kontaminasyona neden olabilecek mikroorganizmaları (bakteri, mantar vb.) ortamdan uzaklaştırmak için dekontaminasyon işlemi uygulanmaktadır. Mikobakteri basili balgamdan yapılan yaymada kolaylıkla direkt saptanabilir. Basilin saptanabilmesi için balgamın her ml'sinde en az 5.000-10.000 basil olması gerekmektedir [8].

**Kültür:** TDM'in tanısında kültür için uygulanacak işlemler TB tanısında uygulanan kültür işlemleri ile aynı şekildedir. Ama hızlı çoğalan TDM'ler dekontaminasyon işlemleri sırasında devamlılığı düşük ve hassasiyeti yüksek olması sebebiyle bu işlemler mikroorganizmaya zarar vermeyecek şekilde olması gerekir. Bazik esaslı bir madde olan NaOH TDM'lere dekontaminasyon işlemi sırasında toksik etki yapabilir. Doku örnekleri ve cilt bütünlüğü bozulmamış vücut bölgelerinden alınan steril sıvı örnekleri herhangi bir dekontaminasyon işlemine ihtiyaç duyulmadan direkt ekilebilir [65]. TDM tespitinde mutlaka kültür tekniği yapılmalıdır. Bunun nedeni ister ilaç duyarlılık testlerinin yapılıp uygun tedavinin seçilmesinde, ister izole edilen suşlarda türün tespit edilmesinde, mikroorganizmanın üretilmesiyle tür

seviyesinde adlandırılmasında çok kıymetlidir. Ancak bu yöntemin geç sonuç vermesi bir dezavantajdır [66].

Çoğunlukla TDM kültürü elde etmek için uygun sıcaklık derecesi 28-37°C'dir. Bir diğer grup örneğin, yavaş üreyen ancak klinik olarak anlamlı mikobakterilerin bir kısmı 35-37°C'de çoğalırlar. İki farklı besiyerlerinden birine 35°C-37°C diğerine ise 28°C-30°C arasında sıcaklık ortamı sağlanırsa TDM'lerin üreme payı daha fazla olur. Hızlı çoğalan mikobakteriler, *M. Haemophilum*, *M. marinum*'de 28-30°C'de sıcaklığı severken, *M. ulcerans* 25-33°C'de daha yavaş üremeyi tercih ederler [66].

TDM türlerinin çoğu pasaj sonrasında 2-3 haftalık zaman diliminde çoğalırlar. Bazı türleri daha uzun bir zamanda, 8-12 haftalık inkübasyona süresine ihtiyaç duyarlar. Bunlara *M. ulcerans* veya *M. genavense* örnek olarak gösterilebilir. Sıvı besiyerlerinde inkübasyon süresi daha da kısalmıştır ve hızlı çoğalan türlerin çoğu ilk yedi gün içerisinde çoğalmaktadır. [29.66].

### 2.5.1.1. Fenotipik Testler

TDM türlerinin fenotipik özelliklerine göre farklı tanımlar sunar. Bunun nedeni türün besiyerde üreme süresi, üreme için uygun ısı, koloni görüntüsü, pigment oluşturma özelliği, farklı olması ve buna bağlı olarak türün identifikasyonudur. TDM'ler için birçok biyokimyasal belirteçler kullanılmaktadır[67].

### 2.5.1.2. Biokimyasal Testler

**Katalaz testi:** Bu test çoğu türler için olumlu sonuç verirken, üç mikobakteri *M. tuberculosis*, *M. gastri* ve *M. kansasii*'yi türleri için olumsuz sonuç vermektedir ve bu özellikleri sebebiyle diğerlerinden ayırt edebilmektedirler. Katalaz aktivitesini saptamak için semikantitatif ve ısı toleransı testi kullanılır. Semikantitatif test mikobakterileri, hava kabarcıklarının yüksekliğinin <45mm veya >45mm oluşturanlar olmak üzere iki gruba ayırır. Enzimin ısı ile bir kısım türlerinin inaktive olması bir tanı yöntemi olarak uygulanmaktadır. Mikobakterilerin tanımlanmasında uygulanan hidrojen peroksit, diğer bakterilerde bulunan enzimin aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaktiften seçiliyor. Hidrofobik olan mikobakterilerin strüktürün bozulması ve enzimin kolay bir şekilde meydana çıkmasını oluşturmak amacıyla testte etkili bir deterjan olan %10 Tween-80' ile %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kombinasyonu uygulanır [67].

**Niasin testi:** Bu testin temeli, özellikle TB, *M. chelonae* ve *M. simiae* türlerinin nikotinik asiti diğerlerine göre daha az metabolize etmeleri sonucunda, besiyerine eklenen niasin ile tespit edilmesidir [68].

**Thiophene-2 karboksilik asit hidrazid testi (TCH):** Yavaş çoğalan mikobakterilerin ekseriyeti ve MTB TCH eklenmiş besiyerinde çoğalırken *M. bovis* çoğalamaz. Middlebrook besiyeri de içine TCH eklenerek hazırlanır. Bu besiyerine pasaj yapılarak türlerin identifikasyonu yapılabilir [68].

**MacConkey agarda çoğalma testi:** Bu agar *M. fortuitum* ile *M. chelonae*'yin diğer türlerden seçilmesinde kullanılır. Özellikle test bu iki mikobakteri türü için önemlidir. [68].

**Üreaz testi:** Avantajı olarak bakterinin üreyi CO<sub>2</sub>'e ve amonyağa parçalayarak, kromojen özelliği olmayanların ve skotokromojen identifikasyonunda kullanılır. Bazı türler pozitiflik (*M. scrofulaceum*) gösterirken, bazıları (*M. avium* ve *M. intracellulare*) üreaz negatiftir. *M. avium* suşların tanımlanması için bu testi daha çok spesifiktir [68].

**Tween 80 testi:** Bu test TDM üyelerinin ayırımı amacıyla kullanılmaktadır. Bazı mikobakteriyel türler tarafından üretilen lipazlar "*polioksietilen sorbitan monooleate*" (Tween 80) deterjanı hidrolize ederek oleik asit ve "*polioksietilen sorbitol*" açığa çıkar. Test pH'sı 7 olan besiyerinde nötral kırmızısı Tween 80 ile bağlanır ve nötral pH'da kehribar rengindedir. Eğer Tween 80 hidrolize edilirse nötral kırmızısı artık bağlı değildir ve pH 7'de kırmızı renge döner [68].

**Nitrat redüksiyon testi:** Esası çoğalma hızı, pigment oluşturma becerileri, koloni morfolojisi gibi bir birine yakı olan türleri ayırmada kıymetlidir. Olay nitroredüktaz enzimine sahip olan mikobakterilerin nitratları nitritlere indirgeyebilmesine bağlıdır. *M. smegmatis* ve *M. fortuitum* bazı saprofit nonkromojenler, *M. szulgai*, *M. tuberculosis* ve *M. kansasii* grubu nitrat redüktaz testi pozitifdir [68].

**Sodyum klorür tolerans testi:** %5'lik NaCl içeren LJ besiyerinde üreyebilme yeteneği, 28°C'de inkübe edildikleri zaman, yavaş üreyenlerden sadece *Mycobacterium trivale*, *M. flavescens*'in bazı suşları, *M. abscessus* ve *M. fortuitum* için ortak özelliktir [68].

Biyokimyasal belirteçler sadece bir kısım mikobakteri türlerinin ayırt edilmesinde yardımcı olmaktadır. Kesin identifikasyon amacıyla bu yöntemlerin birkaçının bir arada kullanılması gerekmektedir. Son yıllardaki çalışmalar, sadece geleneksel biyokimyasal analizlerin rutinde kullanımının zaman alıcı olması nedeniyle tanıda önemli gecikmelere yol açtığını göstermektedir. Geleneksel testlerin tek başına kullanımı ile yeni tanımlanan TDM'in birçoğunun identifikasyonu yapılamamaktadır [68].

### 2.5.1.3. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler genetik tanı metodlarından kültür üreme tekniklerinin uzun sürmesi, özgüllük ve duyarlılığının yüksek olması, sebebiyle TB laboratuvarlarında son dönemlerde daha fazla kullanılmaya başlamıştır. Değişik moleküler teknikler mikobakterilerin direkt identifikasyonu açısından güvenilirlik, performans ve hız itibarıyla klasik metodlara bakılırsa daha çok üstünlük sağlamaktadırlar. Mikobakterilerin moleküler yöntemlerle identifikasyonunda, 16S rRNA, *hsp65*, *recA* ve *rpoB* genleri hedef olarak gösterilen en önemli bölgelerdir. Bakterilerin moleküler identifikasyonunda 16S rRNA geni, her bakteriye özgül çok iyi korunmuş seriler içerir ve her türe göre farklı serilere sahiptir. Bu değişken dizilerin PCR ile çoğaltılması sonucunda mikobakteri türlerinin tanımlanması mümkün olabilmektedir [69].

İlk kez Telenti ve arkadaşları, tüm mikobakterilerde mevcut olan 439 bp'lik ısı şok proteinini kodlayan genin (*hsp65*), restriksiyon enzimi ile kesilmesi prensipine dayalı hızlı ve kolay bir yöntem olan PCR-RFLP'yi geliştirmişlerdir [69]. İzole edilen mikobakteri DNA'sı PCR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra *BstE* II ve *Hae* III restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesilen bölgeler poliakrilamid jel elektroforezinde moleküler ağırlık standartlarına göre birbirlerinden ayrılarak mikobakteri tiplendirilmesi yapılmıştır. PCR-RFLP yöntemi ile yapılan çalışmalarda PCR'nin hassasiyeti pozitif örnekler preparatlarında % 95 iken, negatif preparatlarda % 50-60 arasında, spesifikliğı ise % 98'ler oranında saptanmıştır. Bu sebeple modern uygulamalarda yaygın pozitif olguların tercih edilmesi uygundur [70,71,72].

**PCR:** PCR ile tiplendirme metodlarında mikrobiyal genom yapısının tamamını veya bir kısmını tarama fonksiyonuna sahiptir. Bu tiplendirme metodları genellikle bilgisayar destekli olarak DNA dizi analizi, fingerprint profili yada karşılaştırmalı tiplendirme şeklindedir. Bu yöntemle herhangi bir DNA molekülünün seçilmiş parçaları çoğaltılabilir ve değişken DNA segmentlerinin çoğaltılması ile yakın ilişkili suşlar arasındaki farklılıkları gösterebilir. Günümüzde kullanılan en iyi ayırım yapabilen PCR temelli fingerprint metodları tüm genom analizine dayanırlar. PCR aracılı fingerprintler ile tür, alt tür ve suş seviyesinde benzerlik veya çeşitlilik verileri elde edilebilmekte ve geniş bakteri koleksiyonlarına uygulanabilmektedir [73].

**Ticari Moleküler Problar:** Akridinyum ester işaretli DNA probları 16S rRNA'yı *gordoniae* ve TB ailesi için Gen-Probe Inc, AccuProbe gibi ticari problar mevcuttur. Problar her iki besiyerlerinde uygulanabilir. Maliyeti yüksek metod olmasına rağmen, uygulanması çok kolaydır. Prob hibridizasyon metodunun sensitifliğı %85-100, özgüllüğü %100 olarak raporlanmaktadır. *M. celatum* ile TB arasında kros tepkime görülebilir. Bu metodun da ksıtlılıkları vardır, nitekim az sayıda TDM üyelerini tanımlayabilir. [2,53].

**Line Prob Teknolojisi (Bant Testleri):** Hedefe yönelik ampikonların revers hibridizasyonu ve biotin ile kaydedilmiş primerler uygulanarak realize edilen PCR esaslı bir

metoddur. İki farklı line prob piyasada bulunur; İnno LIPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Belçika) ve GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience, Almanya)[74].

Inno LIPA metodunda 16S-23S rRNA işaretlenir. 17den fazla mikobakteri türü tek bir bant test ile tespit edilebilir. Bunlara MAC, *M. fortuitum* kompleksi, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. celatum* *M. haemophilum* ve *M. marinum*/*M. ulcerans* dahildir. Bant testi spesifikliğı %94, sensitivitesi %100'dür [74].

GenoType Mycobacterium tekniğinde 23S rRNA'yı esas alan çoklu PCR ve ardından bant prob teknolojisinin kullanıldığı ters hibridizasyon işlemi uygulanmaktadır. Bu yöntem için geliştirilmiş üç ayrı kit vardır: MAC üyelerinin birbirinden ayırt eden GenoType MTBC kiti, sık rastlanan mikobakterileri ayırt eden GenoType Mycobacterium CM ve az rastlanan mikobakterileri tanımlayan GenoType Mycobacterium AS. CM ve AS kitleri birlikte kullanıldığında, *M. interjectum*, *M. avium*, *M. goodii*, *M. chelonae*, *M. asiaticum*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. celatum*, *M. fortuitum* *M. genovense*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. lentiflavum*, *M. marinum*, *M. gastri*, *M. ulcerans* *M. phlei*, *M. peregrinum* *M. heckeshornense*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. shimoidei* ve *M. haemophilum* türleri de ilave olmakla 30'a yakın TDM tanıyabilir. Testin tekniğı ve raporlanması kolaydır. DNA dizi analizi ile karşılaştırıldığında CM kitinin duyarlılığı %97, özgülüğü %92, AS kitinin duyarlılığı ve özgülüğü %99 olarak bildirilmiştir [74].

**DNA Dizi Analizi:** Mikobakterileri türlerinin identifikasyonunda DNA seri çalışması çok avantajlı olarak değerlendirilmektedir. Bu metodla ilk olarak PCR ile istenen gen bölgesi sayısal çoğaltılır, sonrasında otomatik dizileme cihazı ile ampikonların nükleotid dizileri ayırt edilir. 16S rDNA tarafından kodlanan seri, emniyetli ve çoğunlukla değişken (hipervariabl) bölgeler bulunduran 16S rRNA genine ait bir seridir. Mikobakterilerin tanımlanması için değerlendirilen iki değişken dizi A ve B bölgeleridir. A bölgesinin TDM üyelerinin dizi analizi için yeterlidir. B bölgesinin A bölgesinin yeterli olmadığı durumlarda dizi analizi çalışılabilir. Ayırt edilmesi zor olan türler için, örneğin *M. shimoidei* / *M. trivale*, *M. kansasii* / *M. gastri* ve *M. ulcerans* / *M. marinum* gibi benzeyen türler için A bölgesinin çalışması yapıldıktan sonra, türün kesinleşmesi amacıyla B bölgesi de çalışılabilir. *M. chelonae* ve *M. abscessus* gen bölgeleri ayırt edilemeyebilir. Bu türler için değişken 16S rRNA gen seri analizi ihtiyaç duyulur veya identifikasyonunda ek bölgelerinin dizi analizi gerekmektedir[2,75].

MAC üyelerini 16S rRNA dizi analizi tek başına tanımlayamamaktadır. Mikobakterilerin tanımlanması amacıyla çalışma için en önemli hedef gen bölgeleri; 16S rRNA, *hsp65*, ITS, *gyrB*, *recA* ve *rpoB*'dir [2,75].

Dizi analizi için kullanılabilir GenBank, RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microsystems database) EMBL (European Molecular Microbiology Laboratory) gibi çeşitli veri tabanları internet aracılığı ile kullanılabilir. MicroSeq Sistemi (Applied Biosystems, CA) ticari bir 16S rDNA dizileme sistemidir. Bu sistem ile TDM'lerin 500 bp uzunluğunda DNA dizisi otomasyon ile belirlenebilmektedir. Bu sistemin dezavantajı, suşların veritabanındaki diziler ile tam olarak uyuşmamasıdır. Bu suşlar, veritabanındaki diziler ile arasındaki farklılıklara göre "en yakın tür" olarak bildirilirler [75].

**DNA Çipleri:** Temelinde 16S rRNA genine özgül problemleri olan, kökeni belli olmayan floresan hedefli ampikonların hibridize edilmesine dayanmaktadır. Tek kullanımda bile birden fazla kökenin tanımlanmasında faydalıdır. TDM'lerin tanımlanmasında ve TB'nin rifampisin direncine sebep olan *rpoB* gen mutasyonlarının tespit edilmesinde kullanılır. Pahalı olması metodun bilinen kısıtlılıklarından biridir [74].

**Pirosekanslama:** Yeni bir yarı otomatize DNA dizileme yöntemidir. Bu yöntem (Biotage, Upsala, İsveç) DNA yapımı sırasında pirofosfat (PPi) salınımını saptamaktadır. Enzimatik tepkime görünür ışık olarak saptanabilmekte ve bu ışık luminometrik olarak ölçülmektedir. Işık miktarı bağlanan nükleotidlerin sayısı ile orantılıdır. Pirosekanslama kısa dizilerin (20-30 baz) hızla saptanmasında başarılı olmakla birlikte 300-500 bp dizilerin saptanmasında geleneksel DNA dizileme yöntemi (Sanger) kadar ayırt edici değildir. Bu yöntemin olumsuz yönü, diğer dizileme yöntemlerinde olduğu gibi kullanılan veritabanlarının kalitesinin ve güvenilirliğinin sorgulanabilir olmasıdır [74].

**Mikolik Asit Analizi:** Günümüzde TDM enfeksiyonlarının tanısında yaygın olarak kullanılıyor. Mikobakteri hücre duvarının bir kısmını oluşumunda rol oynayan uzun zincirli  $\beta$ -hidroksi yağ asitleridir. Her tür kendine özgül fonksiyonel gruplara ve çeşitli sayıda örneğin 60-90 aralığında karbon sayılı hücre duvarında mikolik asitlere sahiptir[76]. Türe özgü farklılıklar sebebiyle mikolik asit analizi mikobakteri türlerinin identifikasyonunda önemlidir. Bu amaçla "yüksek performanslı sıvı kromatografi" (high-performance liquid chromatography -HPLC), "ince tabaka kromatografi" (thin-layer chromatography- TLC) ve "gaz-sıvı kromatografisi" (gas-liquid chromatography- GLC) teknikleri kullanılmaktadır[77].

TLC yönteminde mikolik asitler onlarda bulunan ester gruplarına göre yedi grup başlığında derlenmektedirler. Bir sonraki kademe, mikobakteri hücre duvarından metal esterifikasyonu yoluyla temizlenen mikolik asitler silikon jel üzerinde yürütülür ve görülen çizimler hazır suşlarla kombine edilerek tanımlanma yapılabilmektedir[2,77].

HPLC yönteminde, karbon sayılarına ve yoğunluğa göre mikolik asitler değişkenlik gösterir. Kısa karbon zincirli ve daha yoğun olan mikolik asitler, çok kısa dağılım süresine

sahiptirler. Bir sonraki aşamada oluşan kromatogramlar tipik suşların grafikleriyle kombine edilerek tanımlama yapılır [2,77].

GLC ve TLC metodlarıyla farklı türler aynı grafik paternlerini oluşturması sebebiyle, her türün tanımlanmasında zorluklar oluşturuyor [2]. Özellikle hızlı üreyen mikobakterilerin mikolik asit paternlerinin çok benzer olması ve benzer şekilde *M. avium*-*M. intracellulare* ayrımındaki güçlükler, mikolik asit analiz yöntemlerinin dezavantajlarıdır [76]. Mikolik asit analizi; pahalı ekipman ve yüksek maliyet gerektirmesi nedeniyle yalnızca referans laboratuvarları tarafından kullanılması önerilmektedir [77].

TDM üyelerinde son 10 yılda göze çaracak bir yayılım, çevredeki koşullarından ve hızlı çoğalabilme yeteneklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla beraber klinik laboratuvar tekniklerinde, yeni moleküler tekniklerdeki gelişmeler TDM türlerinin ayrımını sağlamakta ve rolü büyüktür [29].

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1.Çalışma Grubu**

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında 2015-2019 tarihleri arasında klinik örneklerden izole edilmiş 296 suş çalışmaya dahil edildi. Örneklerin dağılımı : balgam 210 (%71), idrar 40 (%13.6), steril vücut sıvısı (SVS) 14 (%4.7), bronkoalveolar lavaj (BAL) 5 (%1.7), plevra sıvısı 12 (%4 ), apse 9 (% 3), açlık mide sıvısı (AMS) 6 (% 2) şeklindedir. Hasta örneklerinin gönderildiği klinikler ise Göğüs hastalıkları, Pediatri, Kardiyoloji, Enfeksiyon, Üroloji, Nöroloji, Silifke Verem Savaş Dispanseri, Anamur Verem Savaş Dispanseri ve Tarsus Verem Savaş Dispanseri'dir.

Çalışmamızda TDM olduğu belirlenen suşların PCR-RFLP yöntemiyle tiplendirilmesi yapıldı.

#### **3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler**

##### **3.2.1. Kullanılan Cihazlar**

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait kullanılan cihazlar şunlardır:

- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye )
- Biyogüvenlik kabini (Nuair NU 425-300E Class II, A.B.D)
- Hassas terazi (Sartorius BL310, Almanya)
- Distile su cihazı (Millipore, Fransa)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich-Micro 200R, Avustralya)
- Midi santrifüj (Avustralya)
- Vorteks (Nüve NM-110, Türkiye)
- Sıcak su banyosu (Nüve BM 402 Türkiye)
- -80°C'lik derin dondurucu (Heto, Çin)
- +4°C'lik soğutucu (Ariston, Türkiye)
- Otoklav (Hirayama- HA-300 M4, Japonya)
- Elektrik ocağı (Beko, 0.710, Türkiye)
- Işık mikroskobu (Olympus, Japonya)

- Yatay çalkalayıcı (IKA, Werke Typ VX2, Brezilya)
- pH metre (Hanna, İtalya)
- Mikrodalga fırın (Beko-MD 1500, Türkiye)
- Mikropipet seti (Biohit, Proline 0,5µL-1000µL, Finlandiya)
- PCR cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler, Almanya)
- Elektroforez tankı (Agagel Mini Biometra, Almanya)
- Elektroforez güç kaynağı (Biometra P30, Almanya)
- Jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa)
- Homojenizatör (Heidolph Tip F/F, İngiltere)

### 3.3. Yöntem

#### 3.3.1. Suş canlandırma

Saklanmış suş derin dondurucudan çıkarıldı. Tüp içeriğinin erimesini beklemeden steril öze ile alınarak besiyerine (Middlebrook 7H9, LJ, Versa Trek) ekim yapıldı. İnkubasyon için 4-6 hafta bekletildi.

#### 3.3.2. İmmünokromatografik yöntem

##### **Kart test (TB Ag MPT64 Hızlı Tanı Testi)**

İmmünokromatografik bir yöntem olan ve MTBC grubunda bulunan MPT64 antijenini tanımaya yönelik olarak kullanılan SD Bioline Ag MPT64 Rapid™ ticari kiti (Standard Diagnostics, Kore), katı (LJ) veya sıvı (Versa-TREK) besiyerlerinde üreyen mikobakterilerin MTBC-TDM ayrımı yapılmasında kullanıldı. Üremesi olmuş ve saf olarak sonuçlanmış olan sıvı besiyerinden alınan 100 µl örnek doğrudan kullanıldı ve test yapıldı. LJ besiyerinden alınan 3-4 adet koloni 300 µl nükleaz free su içerisinde süspansiyon edildi, bu süspansiyondan 100 µl'lik örnek kullanıldı ve test sonuçları 15 dakika sonra değerlendirildi. Tek başına kontrol bandı oluşması negatif, kontrol ve test bandında çizgi oluşması pozitif sonuç/MTBC olarak kabul edildi. Kontrol bandının hiç oluşmaması halinde test geçersiz kabul edilerek çalışma tekrarlandı.

### 3.3.3. DNA izolasyonu

1. Üremenin olduğu katı besiyerlerinden 1 öze dolusu koloni 1 ml distile suya alındı.
2. Benmaride 20 dakika 60°C inkübe edildikten sonra 12000 × g'de 10 dakika santrifüj edildi.
3. Supernatant tamamen atılır ve yaklaşık olarak 200 µl sıvı üzerine 200 µl sadece kloroform eklenip vortekslendikten sonra 6000 × g'de 1 dakika santrifüjde çevrildi.
4. Supernatant atılmadan üzerine 200 µl steril su eklendi. 6000 × g'de 1 dakika santrifüj edildi.

### 3.3.4. PCR- Amplifikasyon aşaması

Bu aşamada PCR'da mikobakterilerin ısı şok proteini (hsp65), özgül primerler ile çoğaltıldı. PCR ile çoğaltılan bölgelerin amplifikasyon ürünleri % 3'lük agaroz jele yüklenerek elektroforez yapıldı. Bant oluşumu gözlenen örnekler *Hae III* ve *BstE II* enzimleri ile kesildi. Örnekler agaroz jelde yürütülerek elde edilen bant uzunluklarına göre mikobakteri türlerinin identifikasyonu yapıldı. 50 ml PCR karışımı steril distile su, tampon (1X) (promega), MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), dNTP (200 µl ), primer Tb 11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) primer Tb 12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT), Taq polimeraz (2.5 U/µl) ve ekstrakte edilen DNA 'ya uygun miktarlarda kullanılarak mix hazırlandı [78]. Amplifikasyon koşulları Tablo 3.2 'de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Amplifikasyon koşulları

Başlangıç denatürasyonu	95 °C'de 10 dakika	
Denatürasyon	94 °C'de 1 dakika	45 siklus
Primer bağlanması	55 °C'de 1 dakika 45	
Uzama	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

### 3.3.5. Parça Uzunluk Polimorfizmi Tekniği

Amplifikasyonun doğru bir şekilde gerçekleştiğini test etmek amacı ile amplifiye olan bölgeler % 3'lük agaroz jelde analiz edildi. Jel içerisine 0.5 mg/ml etidyum bromür eklendi. Daha sonra, PCR reaksiyonu ürünlerine 6X yükleme tamponundan 1/5 oranında (1 hacim yükleme tamponu, 5 hacim PCR reaksiyonu ürünü) eklendi. Örnekler agaroz jele yüklendikten sonra 100mA, 70 Voltta 35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Primerlerin çoğalttığı bölge 439 bp'lik olup, beklenen bant uzunluğu, moleküler marker (Roche'dan DNA 100 base pair ladder (katalog no:1721933) yardımıyla yorumlandı. Beklenen bantlar elektroforez sonucu tespit

edildikten sonra restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim reaksiyonu Tablo 3.3 'deki gibi hazırlandı.

İçeiğinde *BstE* II bulunan tüpler 60 °C' de, *Hae* III bulunan tüpler ise 37 °C' de iki saat bekletildi. Buradan alınan örnekler % 4' lük agarozaya yüklenip, 100mA, 70 Voltta 35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Neticenin görüntüsü Uvitec jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekilerek yorumlandı. Her iki enzimle kesim sonucu elde edilen bant uzunluklarına göre mikobakteri türlerinin identifikasyonu yapılarak Tablo 3.4' deki tür değerlendirme cetveline göre mikobakteriler tür düzeyinde değerlendirildi.

**Tablo 3.3.** Kesim reaksiyonu birleşenleri

	Stok	Son Hacim
Restriksiyon enzim tamponu	10X	1X (2.5µl)
Restriksiyon enzimi	10 Ü/ µl	1Ü/µ (0.5)
PCR ürünü	—	10 µl
Distile su	—	11 µl
Son Hacim	—	24 µl

**Tablo 3.4** Mikobakteri tür değerlendirme cetveli

<i>BstE</i> II	<i>Hae</i> III	Mikobakteri Türü
Kesim yok /442	190/80/60	<i>M. gadium</i>
	180/140	<i>M. triviale</i>
	175/85/60	<i>M. gallinarum</i>
	160/80/60	<i>M. parafortuitum</i>
	150/130	<i>M. lentiflavum I</i>
	140/105/70	<i>M. szulgai</i>
	140/80/70	<i>M. duvalii</i>
	140	<i>M. flavescens I</i>

<p>325/140</p>	<p>210 200/70/60 175 160/170 155/85</p>	<p><i>M. chelonae I</i> <i>M. aichiense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. immunogen I</i> <i>M. mucogenicum I</i></p>
<p>325/115</p>	<p>190/140 190/140 180/150 175/120/60 155/85 155/85/60 150/130 140/115/65 140/105 140/100/80 140/65/60</p>	<p><i>M. terrae</i> <i>M. diernhoferi</i> <i>M. neoarum, M. aurum II</i> <i>M. rhodesiae</i> <i>M. Mucogenicum III</i> <i>M.chitae</i> <i>M. lentiflavum II</i> <i>M. gordonae IV</i> <i>M. genavense</i> <i>M. kansasii V</i> <i>M. chelonae II</i></p>
	<p>210/70 200/135 200/115/80 180/60/55 175 160/115/80 160/70</p>	<p><i>M. abscessus II</i> <i>M. simiae</i> <i>M. ulcreans</i> <i>M. austroafricanum</i> <i>M. scotochromogen</i> <i>M. marinum</i> <i>M. abscessus I</i></p>

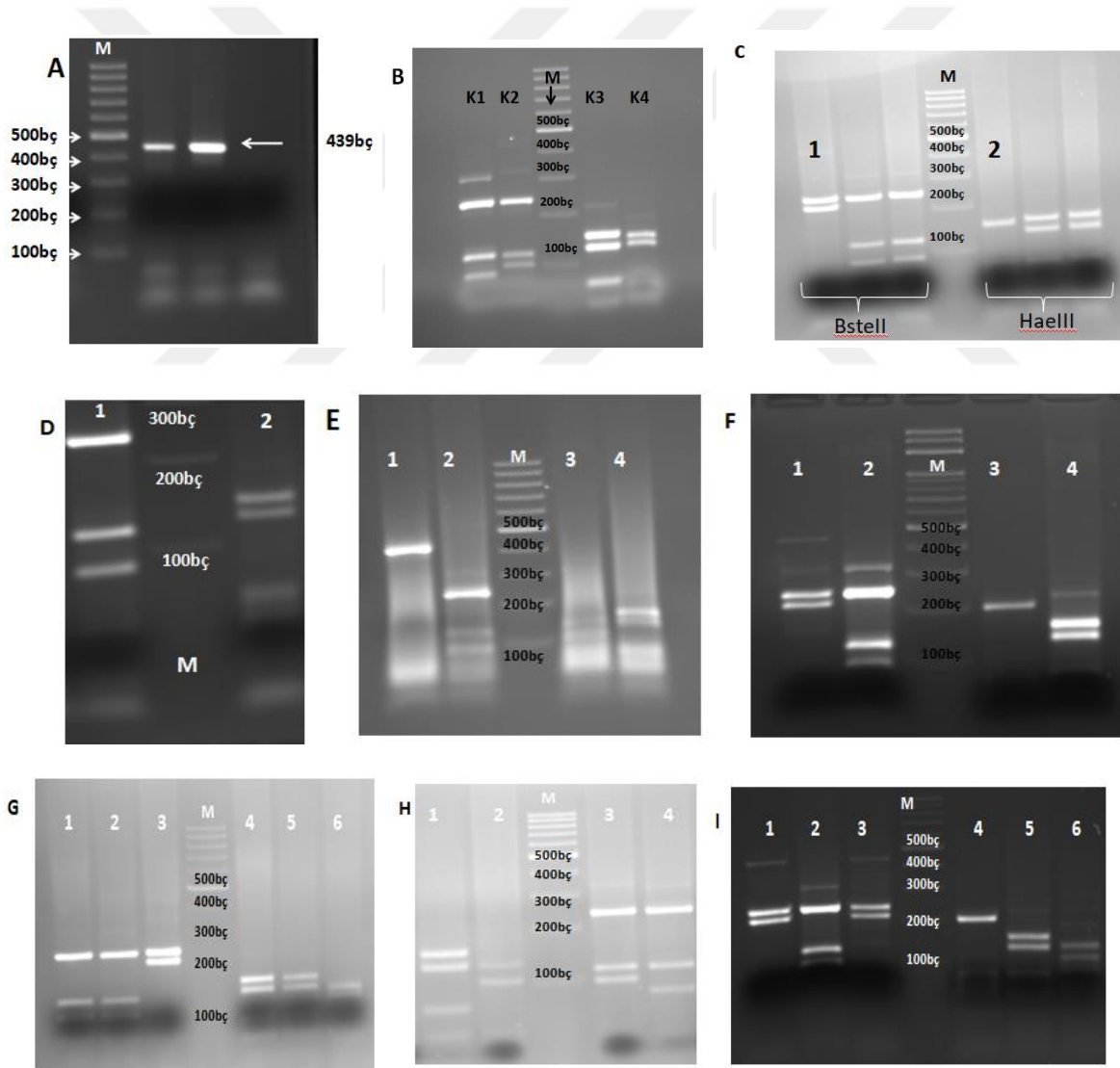
<p>245/220</p>	<p>155/150/100 155/150/50 155/140 150/135/100 150/125/100 150/100 150/80 150/80/60 140/115 140/105/60 140/75/60</p>	<p><i>M. peregrinum II</i> <i>M. scofulaceum</i> <i>M. simiae II</i> <i>M. peregrinum II</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. flavescens II</i> <i>M. phlei</i> <i>M. chubuense</i> <i>M. gordonae IV</i> <i>M. avium</i> <i>M. celatum</i></p>
<p>245/140/85</p>	<p>175/80 160/130/60 155/150/100 150/110/70 150/80/60 140/120/95 140/105/70 140/105</p>	<p><i>M. aurum I</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. pregrinum II</i> <i>M. shimodei</i> <i>M. tokaiense</i> <i>M. gordonae IV</i> <i>M. gastri</i> <i>M. kansasii</i></p>
<p>245/115/100</p>	<p>170/115 155/140/60 155/110/70</p>	<p><i>M. gordonae III</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. malmoense</i></p>

	150/135 150/65 140/120	<i>M. lentiflavum III</i> <i>M. hibernae</i> <i>M. gordonae III</i>
245/155/80	235/115 200/150 170/155/60 170/105/60 160/140/70 160 155/135 150/135/60/55 140/115/70	<i>M. gordonae II</i> <i>M. senegalense</i> <i>M. gordonae I</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. tuberculosis complex</i> <i>M. nonchromogenicum I</i> <i>M. fortuitum I</i> <i>M. fortuitum II</i> <i>M. kansasii IV</i>

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya 296 suş dahil edildi. Hastaların % 58 'i erkek (172) , % 42'si kadın (124)'di.

İmmünokromotografik yöntem ile örneklerin 47'si (%15.87) TDM, 249'u (%84.12) ise MTBC olarak saptandı. Örnekler *Mycobacterium spp.* olarak tanımlandıktan sonra *BstE* II ve *Hae* III enzimleri ile kesim yapılarak TDM'ler tiplendirildi. Çalışmamızda TDM'lerin tür dağılımı: *Mycobacterium intercellularea* %1.35 (n=4), *Mycobacterium fortuitum* %1.01 (n=3), *Mycobacterium simiae* %0.68 (n=2), *Mycobacterium szulgai* %0.68 (n=2), *Mycobacterium kansasii* %0.34 (n=1), *Mycobacterium abscessus* %0.34 (n=1), *Mycobacterium scrofulaceum* %0.34 (n=1), *Mycobacterium gordonae V* %0.34 (n=1) olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1 ve Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. TDM'lerin *BstE* II ve *Hae* III enzimleri ile kesilmiş bant görüntüleri.

A) *Hsp65* gen bölgesinin amplifikasyon ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü.

- B)** H37Rv; K1; *BstE* II kesim ürünleri [245,125,80bç] /K3; *Hae* III kesim ürünleri [160,140,70 bç].
- M. intracellulare* ; K2; *BstE* II kesim ürünleri [245,125,100 bç]/K4 *Hae* III kesim ürünleri [155,140,60 bç].
- C)** *M. abscessus* : Kolon 1; *BstE* II kesim ürünleri [245,220 bç] ;kolon 2; *Hae* III kesim ürünleri [160,60 bç]
- D)** *M. fortuitum*: Kolon 1; *BstE* II kesim ürünleri [245,125,80 bç] ; kolon 2; *Hae* III kesim ürünleri [150,135 bç].
- E)** H37Rv; Kolon 2; *BstE* II kesim ürünleri [245,125,80 bç]/Kolon 4; *Hae* III kesim ürünleri [160,140,70 bç] . *M. szulgai*; kolon 1; *BstE* II kesim ürünleri[439 bç]/ kolon 3; *Hae* III kesim ürünleri [140,105 bç].
- F)** H37Rv; Kolon 2; *BstE* II kesim ürünleri [245,125,80 bç]/Kolon 4; *Hae* III kesim ürünleri [160,140,70 bç]. *M. simiae*; Kolon 1; *BstE* II kesim ürünleri [245,220 bç]/ kolon 3; *Hae* III kesim ürünleri [200,135 bç] .
- G)** MTBC; Kolon 1-2; *BstE* II kesim ürünleri [245,125,80 bç]/ Kolon 4-5; *Hae* III-kesim ürünleri [160,140,70 bç]. *M. gordonae* V; kolon 3; *BstE* II kesim ürünleri [245,220 bç]/kolon 6; *Hae* III kesim ürünleri [140,115 bç] .
- H)** MTBC; Kolon 4; *BstE* II kesim ürünleri [245,125,80 bç]/ Kolon 1; *Hae* III kesim ürünleri [160,140,70 bç]. *M. kansasii*; kolon 3; *BstE* II kesim ürünleri [245,125,100 bç]/kolon 2; *Hae* III kesim ürünleri [140,105,70 bç].
- I)** MTBC; Kolon 2; *BstE* II kesim ürünleri [245,125,80 bç]/ Kolon 5; *Hae* III-kesim ürünleri [160,140,70 bç]. *M. simiae*; kolon 1; *BstE* II kesim ürünleri [245,220 bç]/kolon 4; *Hae* III kesim ürünleri [200,135 bç]. *M. scrofulaceum*; kolon 3; *BstE* II -kesim ürünleri [245,220 bç]/kolon 6; *Hae* III kesim ürünleri [155,135,95 bç].

**Tablo 4.1.** PCR-RFLP ile analizi yapılan türlerin *BstE* II ve *Hae* III profilleri

Tür	<i>BstE</i> II	<i>Hae</i> III
<i>M.intracelularea</i>	245-125-100	155-140-60
<i>M. fortuitum</i>	245-125-80	150-135
<i>M. simiae</i>	245-220	200-135
<i>M. szulgai</i>	439	140-105
<i>M. kansasii</i>	245-125-100	140-105-70

M. abscessus	245-220	160-60
<i>M. goodii</i>	245-220	140-115
M. scrofulaceum	245-220	155-135-95



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Uzun yıllar boyunca TB hastalığının gölgesinde kalan ve önemsenmeyen TDM enfeksiyonları, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastaların yanı sıra, sağlıklı insanlarda ve hastanede uzun süre yatan hastalarda kolonize olmakta ve ciddi seyir gösterebilmektedir. Bu enfeksiyonların son yıllarda artarak önem kazandığı çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. [78,79]. Laboratuvar tanı yöntemlerinin özellikle de moleküler yöntemlerin gelişmesi TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanabilmesine olanak sağlamış, zahmetli konvansiyonel yöntemlerin önüne geçmiştir [7].

Moleküler yöntemlerin gelişmesi aynı zamanda yeni türlerin keşfini kolaylaştırmış ve 1986'da 50 tane oldukları sanılan TDM tür sayısı günümüzde 140'ın üzerine çıkmıştır(72). TDM türünün fazla olmasına rağmen 25 kadarı sıklıkla enfeksiyon etkeni olarak görülmekte, diğerleri çevresel olarak bulunup nadiren klinik örneklerden izole edilebilmektedir (80).

Çalışmamıza dahil edilen 2015-2019 yılları arasında izole edilen solunum yolu ve solunum yolu dışı tüm mikobakteri suşlarının % 15.87'si TDM olarak saptanmıştır. ABD'de yapılmış istatistiksel çalışmada izole edilen 3200 mikobakteri türünün 1/3'ünün TDM olarak saptandığı bildirilmiştir [81]. Tüberküloz için endemik olan Kenya'da 2012 yılında yapılan bir çalışmada 361 mikobakteri enfeksiyonunun 15'i (%4,2) TDM olarak bildirilmiştir [81]. 2013 yılında Nijerya'da yapılan bir çalışmada ise 444 mikobakteri izolatının 69'u (%15,5) TDM olarak tespit edilmiştir. Gelişmiş ülkelerde ortalama yaşam süresinin uzaması, bağışıklık sistemini baskılayan tedavi ve hastalıkların artması ve enfeksiyonların tanısındaki gelişmeler, TDM enfeksiyonlarının az gelişmiş ülkelere oranla daha yüksek oranda görülmesini açıklayabilir [82,83].

Yapılan çalışmalarda pulmoner TDM enfeksiyonlarının insidansında ciddi artışlar görüldüğü bildirilmektedir [84]. Griffith ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada TDM insidansının dünya çapında 0,7-1,8/100.000 vaka aralığında olduğu bildirilmiştir (29). ABD'de ise solunum yolu enfeksiyonlarında bildirilen TDM insidansı 1.8/100.000 vakadır. Dailloux ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Fransa'da solunum yolu enfeksiyonları içinde TDM insidansı 0,73/100.000 vaka aralığında olduğu belirtilmiştir [84].

Türkiyede TDM enfeksiyonlarının bildirim zorunlu hastalık olmadığından veriler oldukça sınırlıdır. Konya'da 2011 yılında yapılan bir çalışmaya mikobakteriyoloji laboratuvarlarına TB ön tanısı ile gönderilen 1670 örnek dahil edilmiş ve %3,7 kültür pozitifliği bildirilmiştir. Bunların %3,1'i (53/1670) MTBC, %0,6'sı (10/1670) TDM olarak tanımlanmıştır [85]. İzmir'de yapılan çalışmada, 2004-2010 yılları arasında izole edilen solunum yolu ve solunum yolu dışı tüm mikobakteri izolatlarının %23,9'unu TDM'ler olduğu saptanmıştır. Veriler genel olarak

benzer olmakla birlikte farklılıklar göstermektedir. Bu durum kullanılan kültür ve tanı yöntemlerinin duyarlılığı ile yöresel farklılıktan kaynaklanabilir [86].

Mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kültür pozitiflik oranlarının bilinmesi önemlidir. Bu oranların beklenenden yüksek bulunması laboratuvar sorumlusunun dikkat etmesi gereken bir durumdur. Kültür pozitiflik oranlarının doğru ve güvenilir bir sonuç vermesi için örneklerin zamanında ve uygun koşullarda alınması ve en kısa zamanda laboratuvara iletilmesi gerekmektedir. Özellikle bronkoskopi ünitesinden gelen solunum yolu örneklerinde ardışık pozitiflikler ve aynı etkenin izole edilmesi, endoskopik malzemelerin sterilizasyonunda bir sorun olabileceğini akla getirmelidir. Aynı şekilde kültür pozitiflik oranlarının normalin üzerine çıktığı dönemlerde laboratuvar içi kontaminasyon olabileceği de göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle TDM'lerin, hızlı ve doğru şekilde tür düzeyinde tanımlanması önem taşımaktadır [87,88].

TDM tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler; zahmetli, uzun zaman gerektirmekte ve az sayıda türü birbirinden ayırt edebilmektedir. Bu testler yeni mikobakteri türlerinin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadırlar [89,90]. Hızlı ve güvenli sonuç için moleküler tanı yöntemleri daha avantajlı sayılmaktadır. TB tanısında kullanılan moleküler yöntemler genellikle PCR bazlı olup hızlı identifikasyon amacı ile PCR-RFLP yöntemi tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır [91].

Çalışmamızda mikobakterilerin tiplendirilmesi için moleküler teknik olarak PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem: tüm mikobakterilerde bulunan *hsp65*'i kodlayan genin *BstE* II ve *Hae* III restriksiyon enzimleriyle kesilmesi temeline dayanmaktadır. Yayma ve kültür negatif olan olgularda ortamda bulunan basil sayısı çok az sayıda olsa bile TB tanısı yapılabildiği için PCR-RFLP tekniği oldukça duyarlı ve spesifik bir tekniktir. Ancak bu yöntemde bazı mikobakteri türlerinin bant paternlerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle identifikasyon zaman zaman güçleşmektedir. Ayrıca ortamda bulunabilecek inhibitör ya da kontaminant ajanlar nedeniyle ortaya çıkan yanlış pozitif veya yanlış negatif olguların önüne geçilmesi için mutlaka negatif ve pozitif kontrollerle birlikte çalışmak gereklidir(8).

Ali Nur ve ark. tarafından yapılan çalışmada İranlı hastalardan alınan klinik örneklerde TDM izolatları ve MTB insidansı *hsp65* geni üzerinden PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanması amaçlanmıştır. Çalışmaya 380 mikobakteriyel izolat dahil edilmiş. İzolatların, *M. kansasii* (%35,6), *M. simiae* (%16,9), *M. gordonae* (%16,9), *M. fortuitum* (%5,1), *M. intracellulare* (%5,1), *M. avium* (%5,1), *M. scrofulaceum* (% 3,4), *M. gastri* (% 3,4), *M. flavescens* (% 3,4), *M. chelonae* (% 3,4) ve *M. nonchromogenicum* (% 1,7) olarak saptanmıştır (92).

Saifi ve ark. tarafından yapılan çalışmada TDM'lerin tür tanımlaması için 48 farklı mikobakteriyel izolat kullanmışlardır. Tüm seçilmiş izolatlarda hsp65 gen bölgesini 439 baz çifti (bç) uzunluğundaki bölge PCR ile amplifiye edilmiş BstE II ve Hae III restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Yapılan PCR-RFLP reaksiyonu sonucunda, 15 MTB, 1 *M. bovis* ve 32 TDM izolatı tespit edilmiştir. Saifi ve ark. tarafından yapılan çalışmada TDM'lerin tür tanımlaması için 48 farklı mikobakteriyel izolat kullanmışlardır. Tüm seçilmiş izolatlarda hsp65 gen bölgesini 439 baz çifti (bç) uzunluğundaki bölge PCR ile amplifiye edilmiş BstE II ve Hae III restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Yapılan PCR-RFLP reaksiyonu sonucunda, 15 MTB, 1 *M. bovis* ve 32 TDM izolatı tespit edilmiştir. TDM izolatları arasında 11 farklı tür tanımlanmıştır. En sık görülen TDM izolatları *M. kansasii*, *M. gordonae III*, *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum* ve *M. gastri* olarak belirtilmiştir (93).

Bannalıklar ve ark. tarafından yapılan çalışmada 30 balgam örneğinden izole edilen yirmi iki mikobakteri, büyüme hızı, pigmentasyon, kültürel ve biyokimyasal özelliklere göre tanımlanmış ve hsp65 geni PCR ile özgül bölgesi amplifiye edilmiş BstE II ve Hae III restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim işlemi yapılmıştır (RFLP). BstE II ve Hae III restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılan üç MAC izolatının RFLP paternleri her birinde iki fragman bulunan referans *M. avium* suşu ile aynı olduğu söylenilmiştir. *M. intracellulare* referans suşu, her iki enzim ile kesimi sonucu her biri 3 fragman ile farklı bir model gösterdiği belirtilmiştir. Hsp65 geninin PCR-RFLP reaksiyonu sonucunda, MAC izolatlarının *M. avium* olarak doğrulanması yapılmıştır. Bu çalışma *M. avium*' un tanımlanmasında hsp65 gen bölgesinin PCR-RFLP ile tanımlanmasını destekler niteliktedir (94).

İspanyada yapılan çalışma laboratuvarında alınan 13 referans suşunda ve 46 suşta gerçekleştirilmiştir. TDM'in tiplendirmesi biyokimyasal testlerle elde edilen sonuçlar 4-6 haftada elde edildiği, PCR-RFLP yöntemi ile sadece 48 saat sürdüğü belirtilmiştir.. Her iki yöntemde de *Mycobacterium intracellulare*, *M. kansasii* ve *M. fortuitum* en sık saptanan tür olarak gösterilmiştir. PCR-RFLP yöntemi hızlı, ucuz ve basit, Referans Laboratuvarlarında uygulanması, TDM teşhisi için çok faydalı olduğu bildirilmiştir (95).

Ayşe ve ark. tarafında yapılan çalışmada geleneksel yöntemler kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 141 mikobakteriyel izolatın 138'i MTBC olarak saptanmıştır. Moleküler yöntem ile karşılaştırma yapılmış, PCR-RFLP yöntemi ile 141 izolatın 137'si MTBC, 4'ü TDM olarak tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntemle PNB'ye duyarlı olduğu için MTBC olarak değerlendirilen bir izolat PCR-RFLP yöntemi ile TDM olarak tespit edilmiştir. Tüberküloz dışı mikobakterilerin hsp65 PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanmasında bir izolat *M. abscessus*, üç izolat ise *M. avium* kompleksi olarak belirlenmiştir (96).

## SONUÇ

Çevrede yaygın olarak bulunan ve fırsatçı patojen olan TDM'ler giderek artan sıklıkta görülmektedir. TDM türlerinin büyük çoğunluğu klasik anti-tüberküloz ilaçlarına karşı direnç göstermektedir. Tedaviye başlanmadan önce mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde tespit edilmesi önemlidir. Bu hastaya gereksiz bir ilacın kullanımı, hastanede kalış süresinin uzaması, aynı zamanda ekonomik kayıpları önlemektedir. Çalışmamızda TDM'lerin identifikasyonuna olanak sağlayan PCR-RFLP yönteminin kliniğe hızlı bilgi vermek açısından, ucuz, kolay ve rutin kullanıma uygun bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştı. Elde edilen verilerin bölgemizdeki TDM infeksiyonlarının epidemiyolojisine ait bilgilere katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1]. <https://www.who.int/tb/global-report-2019>
- [2]. Alpaslan A. Non-Tüberküloz Mikobakteri İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı ve Duyarlılık Testleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II .Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun. 2003,Kurs Kitabı; p 388-396.
- [3]. Özkaraş M.H, Esen N, Özkütük A.A Dört Yıllık Süreçte Bir Üniversite Hatanesindeki Tüberküloz Dışı Mikobakterilere Ait İzlem. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018, 48 ,(3), 205-21.
- [4]. Griffith DE, Aksamit T, Brown- Elloit BA, 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.
- [5]. Nolte FS, Metchock. B. Mycobacterium, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Mycobiology. 6th ed. ASM Pres, Washington DC. 1995; p 400-37
- [6]. Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin identifikasyonu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. 1. Basım. Otak Form-Ofset Basım San.Tic.
- [7]. Börekçi G, Aslan G, Aydın E, Fiandaca M J, Stender H , Lee NM , Özkul Y, Emekdaş G . BACTEC MGIT™ Pozitif Kültürlerden Mycobacterium Türlerinin Oligo-FISH ve PNA-FISH Yöntemleriyle Tanımlanması. Mikrobiyol Bul 2014, 48, (3), 385-4 .
- [8]. Bayram G, Emektaş G. Mikobakteri Türlerinin İdentifikasyonunda Polimeraza Zincir Reaksiyonu –Parça Uzunluk Polimorfizmi Tekniği ile Klasik Yöntemler Arasındaki Uyumun Belirlenmesi. Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2008, (3), 1.

- [9]. Kocagöz T. Mikobakteri türlerinin genel özellikleri. İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008; pp. 2277-2311.
- [10]. Huard R C, Fabre M, Hass P, Lazzarini L, C, van Soolingen D ve ark. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the Mycobacterium tuberculosis Complex. *Journal of Bacteriology* 2006, 188, 4271-42-87.
- [11]. Seber E. Tüberkülozun Dünü .*Ankem Dergisi*.2010, 24,(2), 52-60.
- [12]. Karlıkaya C. Tüberküloz Ders Notları.1998.  
<http://celalkarlıkaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>.
- [13]. Hess M, "Commensal or Pathogen –a challenge to fulfil Kochs Postulates", *Br Poult Sci* 2017, 58, 1-12.
- [14]. Barış YD. Dünya’da Tüberkülozun Tarihçesi. *Toraks dergisi*. 2002, 3, (3), 338-340.
- [15]. Fındık S. Yetişkinlerde Tüberküloz Tedavisi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun. 2003.
- [16]. [http://www.nationaljewish.org/healthinfo/conditions/ntm/history\\_08.12.2014](http://www.nationaljewish.org/healthinfo/conditions/ntm/history_08.12.2014).
- [17]. Griffith DE: Nontuberculosis Mycobacteria. “D Armstrong, J Cohen (ed): *Infectious Diseases*”, section 2 ch 31, Mosby, London ,1999.
- [18]. Çakır S. Tüberküloz Plürezide Serum Ve Plevral Sıvı Örneklerinde Early Secreted Antigenic Target-6 (Esat- 6) ve Culture Filtrate -10 (Cfp-10) Antijenlerine Spesifik T-lenfositleri Analizininintanısasal Değeri.Doktora Tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, 2009.
- [19]. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. Basım, Bornova İzmir: Meta Basım, 2009.
- [20]. Köksal F, Yaman A. Farklı Bir Bakteri Topluluğu: Tüberküloz Basilleri Topluluğu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 11-12 Haziran ,2003,.
- [21]. Yüce A. Tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonları. İçinde Yüce A, Özyurt M, Sürücüoğlu S, Uzun M, Sarıgüzel N, editörler. *Mycobacterium tuberculosis ve tüberküloz*. İstanbul, ANKARA, 2016; pp 274-77.
- [22]. Jarzembowski JA. Young MB. Nontuberculosis mycobacterial infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2008, 8,1333-41.
- [23]. Aubry A, Mougari F, Reibel F, Cambau E, *Mycobacterium marinum*, *Microbiol Spectr* 2017, 5, (2), 0038.
- [24]. Johnston JM, Izumi AK. Cutaneous *Mycobacterium marnium* infection ("swimming pool granuloma"). *Clin Dermatol* 1987, 5, (3) ,68-75.

- [25]. Streit M, Böhlen LM, Hunziker T, Zimmerli, Tsharner GG, Nievergelt H et al. Disseminated *Mycobacterium marium* infection with extensive cutaneous eruption and bacteremia in an immunocompromised patient. *Eur J Dermatol* 2006, 16, (1) , 79-83.
- [26]. Hofbauer G, Burg G, Nestle F . Sporotrichoid infection with *Mycobacterium marinum*: successful therapy with oral tetracycline administration. *Hautarzt* 2000, 51, (5), 349-52.
- [27]. Tania M Gonzalez- Santiago, Lisa A Drage. Nontuberculous Mycobacteria: Skin and Soft Tissue Infections. *Epub. Dermatol Clin* 2015, 33, (3), 563-77.
- [28]. Chesney PJ. Nontuberculous Mycobacteria. *Pediatrics in Review* 2002, 23, 300-3009
- [29]. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175, (7), 367-416.
- [30]. Razavi B, Cleveland MG, Cutaneous infection due to *Mycobacterium kansasii*. *Diagn. Microbiol Infect Dis* 2000, 33, (3), 173-5.
- [31]. Ersöz G. Nontüberküloz mikobakterilere bağlı enfeksiyonlar. 15'inci baskı (Çeviri editörü: Sağlık Y); Harrison's Principles of Internal Medicine : New York; 2003, Bölüm 171.
- [32]. Hill CE, Soueid A, Srivastava S. *Mycobacterium szulgai* tenosynovitis :a fishy tale. *Surg Infect (Larchmt)* 2012, 13, (1) , 67.
- [33]. Essteban J.Garcia -Pedrazuela M, Munoz -Egea MC, Alcaide F. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis :an update. *Expert Opin Pharmacother* 2012 ,13, (7), 967-86.
- [34]. Judith A. Ferry , Enfeksiyon Hastalıklarının Tanısal Patolojisinde (İkinci Baskı) , 2018
- [35]. Currier JS. HIV ile enfekte hastalarda *Mycobacterium avium* kompleksi (MAC) enfeksiyonları. *UpToDate* . 2017; <https://www.uptodate.com/contents/mycobacterium-avium-complex-mac-infections-in-hiv-infected-patients> .
- [36]. Koirala J, *Mycobacterium Avium* İncellulare. Medscape Referansı.2018: <http://emedicine.medscape.com/article/222664-overview>.
- [37]. Wolff K, Tappeiner G. Mycobacterial diseases: Tuberculosis and atypical mycobacterial infections. İn: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, editors. *Dermatology in General Medicine*. Vol 2. 3rd ed. New York: McCraw-Hill Book Company, 1987; p. 2152-80.
- [38]. Werf van der TS, Graaf van der WT, Tapperao JW, Asiedu *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lanset*.1999 Sep, 18:354,(9183), 1013-8, doi: 10.1016.

- [39]. O'Brien DP, McDonald A, Callan P, Robson M, Freidman ND, Hughes A et al. Successful outcomes with oral fluoroquinolones combined with rifamicin in the treatment of *Mycobacterium ulcerans*: an observational cohort study. *Negl Trop Dis* 2012,6,(1), 1473.
- [40]. Torkko P, Suomalainen S, Livanainen E, Suutari M, Tortoli E, Paulin L, et al. *Mycobacterium xenoparvum* and related organisms isolated from stream waters in Finland and description of *Mycobacterium botniense* sp.nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000, 50, (3), 283-9.
- [41]. Portales F. Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin Dermatol* 1995, 13, (3), 207-22.
- [42]. Mazumder Shirin A, Hick A and John Norwood. *Mycobacterium gordonae* pulmonary infection in an immunocompetent adult. *N AM J Med Sci* 2010 Apr, 2, (4), 205-207.
- [43]. Gengoux P, Portaels F, Lachapelle JM, Minnikin DE, Tennstedt D, Tamigneau P. Skin granulomas due to *Mycobacterium gordonae*. *Int J Dermatol* 1987, 26, (3), 181-4.
- [44]. Shelley WB, Folkens AT, *Mycobacterium gordonae* infection of the hand. *Arch Dermatol* 1984, 120, (5), 106-5.
- [45]. Sompolinsky D, Lagziel A., Rosenberg I. Further studies of a new pathogenic mycobacterium (*M. haemophilum* sp. nov.). *Can. J. Microbiol.* 1979, 25, 217-226.
- [46]. Davis BR, Brumbach J, Sanders WJ, Wolinsky, E. Skin lesions caused by *Mycobacterium haemophilum*. *Ann Intern Med* 1982, 97, (5), 723-4.
- [47]. Çavuşoğlu C, Saydam C.C, Solak Ö, Bilgiç A. Yaygın *Mycobacterium fortuitum-chelonae* Kompleks İnfeksiyonu Olan Hastanın Laboratuvar Tanısı. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim dalı, Uzmanlık tezi. İzmir. 2000.
- [48]. Miller AC, Commens CA, Jaworski R, Packhan D. The turtle's revenge: A case of soft-tissue *Mycobacterium chelonae* infection. *Med j Aust* 1990, 153, (3), 493-5.
- [49]. Ranjitha J, Sundarsingh T. J.A, Rajan A, Shankar V. *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection and Public Health*. Volum 13, Issue 9, September 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.023>.
- [50]. Wallace RJ Jr, Nash DR, Tsukamura M, Blacklock ZM, Silcox VA. Human disease due to *Mycobacterium smegmatis* *J Infect Dis* 1988, 158, (1), 52-9.
- [51]. Rappaport W, Dunnington G, Norton L, Ladin D, Peterson E, Ballard J. The surgical management of atypical mycobacterial soft tissue infections. *Surgery* 1990, 108, (2), 36-9.
- [52]. Aslan G. Hasta örneklerinin işlenmesi ve kültürde III Tüberküloz sempozyumu ve III Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri uygulama kursu, Kurs kitabı, Adana, 2004. p 10-18.
- [53]. Somoskovi A, Mester J, Hale YM, et al. A, Parsons L M, Salfinger M. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med* 2002, 23, 585-597.

- [54]. Özkara Ş Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. *Türkiyede tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı*. 1. baskı, Ankara: Rekmay Ltd. Şti; 2003, pp 12-14.
- [55]. Yakıcı G. Çoklu İlaç Dirençli (ÇID) Mycobacterium Tuberculosis İzolatlarının Filogenetik İlişkilendirilmesinde Kullanılan IS6110, MIRUVNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Of Tandem Repeat), Spoligotyping Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2013.
- [56]. Isenberg DH. Solid media: selection, inoculation, incubation and examination. Essentials procedures for clinical microbiology. Washington, D.C: ASM Pres, 2000, 182-197.
- [57]. American Thoracic Society. Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria. American Thoracic Society Medical Section Of The American Lung Association. 1997, 1-1-25.
- [58]. G.Middlebrook. M.L. Cohn. W.B.Dye.W.B. Russell. D. Levy.Mikrobiologie procedures of value in tuberculosis. Acta. Tub.Scand. 1960, 38., 66.
- [59]. Isenberg D.H. Liquid media. Essentials procedures for clinical microbiology. D. C: ASM Pres :Washington, 2000, 183-187.
- [60]. Hines N, Payeur JB and Hoffman LJ. Comparison of the recovery of Mycobacterium bovis izlates using MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid J Vet Diagn Invest 2006, 18, 243-250.
- [61]. Murray P.R, Baron E.J, Jorgensen J Hatal. Çeviri: Basusta oğlu A, Kitap9. Baskı, Cilt 1: Klinik Mikrobiyoloji, Atlas Kitapçılık, Ankara , 2009;p 543-586.
- [62]. Brooks G F, Carroll K C, Butel J S, Morse S A. Tıbbi Mikrobiyoloji. Jawetz, Melinski, &Adelberg's medical Microbiology. Twenty- Fourth Edition, The McGraw-Hill Companies. Çeviri: Yenen O S. Kitap: Jawetz, Melinsk ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2010; p 320-332.
- [63]. Brooks G F, Carroll K C, Butel J S, morse S A , Timothy A M. . 26 th Edition ,Medical Microbiology, McGraw Hill Companies, USA, 2013: pp 313-326.
- [64]. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E. At al.Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2006; pp 1064- 1124.
- [65]. Yüce A. Tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonları. İçinde Yüce A, Özyurt M, Sürücüoğlu S, Uzun M, Sarıgüzel N, editörler. *Mycobacterium tuberculosis ve tüberküloz*. İstanbul: ANKARA, 2016; pp 274-77.
- [66]. Uzun M. Non-tüberküloz mikobakteri enfeksiyonlarının epidemiyolojisi. İçinde Akhan S editör. 15. *Türk Klinik Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı* 2011; pp 159-161.

- [67]. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology 9. Baskı ed .Klinik Mikrobioloji, Basustoğlu A.Vol.37., Ankara: Atlas Kitabçılık. 2009; p 573.
- [68]. Perkins MD. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000, 12, 182-188.
- [69]. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Borner T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Mikrobiology.* 1993, 31,(2), 171-178.
- [70]. Ergin A, Kocagöz T, Us Dürdal, Günali A, Polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon enzim analizi ile mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması.Mikrobiyoloji Bult.1999, 33, 251-261.
- [71]. Taylor T,patter'son C,Hale Y, Safranek WW.Routine use of PZR-Restriction fragment lenght polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *Journal of Clinical Microbiology.*1997, 35, (1), 79-85.
- [72]. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E and Fontana R. İdentification of 54 Mycobacterial Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hsp65 Gene . *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39, (8), 2799-2806.
- [73]. Persing D H, Ternover F C, Tang Y at al. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı ve uygulamaları, Palma Yayıncılık, Çeviri: Tekeli A, Ustaçelebi S. Kitap: Ankara ,2006; p 197-221.
- [74]. Sürücüoğlu S. Tüberküloz dışı mikobakteri infeksiyonları: Nerdeyiz?Yeni tanı yöntemleri ve soruları.15.Türk Klinik Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı (Ed. Akhan S), 23-27 Mart 2011, s 166-171
- [75]. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2003, 83, 91-7.
- [76]. Safianowska A, Walkiewicz R, nejman -Gryz P Chazan R, Grubek- Jaworska H.[The comparison between two methods fir typing of nontuberculous mycobacteria : high pressure liquid chromatography and molecular assay Geno Type *Mycobacterium CM/AS*].*Pneumanol.Alergol.Pol.*2010 jan, 78, (5), 363-8.
- [77]. Tortoli E.The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med.Microbiol.* 2006 Nov, 48 , (2), 159-78.
- [78]. Da Costa ARF, Lopes ML, Furlaneto IP, de Sousa MS, Lima KVB, Molecular identification of nontuberculous mycobakteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. *Diagn. Microbiol.İnfect. Dis* 2010, 68, (4), 90-4.
- [79]. Dai J, Chen Y, Dean S, Morris JG, Salfinger M, Johnson J a. Multiple-genome comparison reveals new loci for *Mycobacterium* species identification. *J. Clin. Microbiol.* 2011 Jan, 49, (1), 144-53.

- [80]. Van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin. Respir Crit. Care Med.* 2013 Feb, 34, (1), 103-9.
- [81]. Good RC, Snider DE. Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States. *J. Infect Dis.* 1982, 146, 829-33.
- [82]. Nyamogoba HDN, Mbuthia G, Mining S, Kikui G, Biegon R, Mpoke S, et al. HIV coinfection with tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in western Kenya: challenges in the diagnosis and management. *Afr. Health Sci.* 2012 Sep, 12, (3), 305-11.
- [83]. Aliyu G, El-Kamary SS, Abimiku A, Brown C, Tracy K, Hungerford L, et al. Prevalence of Non-Tuberculous Mycobacterial Infections among Tuberculosis Suspects in Nigeria. *PLoS One.* 2013 Jan, 8, (5), 63170.
- [84]. Dailloux 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 Dec, 28, (6), 1211-5.
- [85]. Kurtoğlu M. Tüberküloz Şüpheli Hastalardan *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolasyon Oranı ve Suşların BACTECTM NAP ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64 RapidTM Testleri ile Tanımlanması. *Immunochromatographic Mikrobiyol. Bul.* 2011, 45, (2), 276-73.
- [86]. Türkel S. Klinik örneklerden izole edilen Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin dizi analizi ile tanımlanması. 2013. Uzmanlık tezi. İzmir.
- [87]. Özkütük N. Klinik Materyalin Hastadan Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi .21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun 2003.
- [88]. Middleton AM, Disinfection of bronchoscopes, contaminated in vitro with *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium* and *Mycobacterium chelonae* in sputum, using buffered peracetic ("Nu-Cidex") acid solution. *J. Hosp. Infect.* 1997, 127-43.
- [89]. Brown-Elliot BA, Wallace RJ. *Mycobacterium*: General Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria. İçinde Jorgensen JH, Paller MA, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, editörler. *Manual of Clinical Microbiology* ASM Press: Washington DC, 2015; pp. 595-612.
- [90]. Simner PJ, Stenger S, Richter E, Brown-Elliot BA, Wallace RJ, Wengenack NL. *Mycobacterium*: General Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria. İçinde Jorgensen JH, Paller MA, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, editörler. *Manual of Clinical Microbiology* ASM Press: Washington DC; 2015; pp. 570-95.
- [91]. Kendall B a, Winthrop KL. Update on the epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2013 Feb, 34, (1), 87-94.

- [92]. Neamatollahie A.N, Ebrahimzadeh N, Siadat S.D, Farzam V, Eslami M, Sepahi A.A, Khanipour Sh, Masomi M, Sakhae F, Jajin M.G, Bahrmand A, Fateh A. Distribution of non tuberculosis mycobacteria strains from suspected tuberculosis patients by heat shock protein 65 PCR- RELP.(2017).Saudi Journal of Biological Sciences.doi org /10.1016.
- [93]. Saifi M, Jabbarzadeh E, Bahrmand A.R, Karimi A, Pourazar S, Fateh E, Masoumi M, Vahidi E. HSP65 PRA identification of nontuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. Clin Microbid Infect. 2013, 19, (8) , 723-8.
- [94]. Bannalikal A.S , Verma R. Detection of Mycobacterium avium & M. tuberculosis from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of hsp65 gene & pncA PCR. Indian J Med Res 2006, 123, (2), 165-72.
- [95]. Sergio L Yzquierdo S, Liliam Mederos C, Alexis Diaz G, Miguel Echemendia F, Ernesto Montoro C. Application of PCR-RFLP in the diagnosis of non-tuberculous mycobacteria. Rev Chilena Infectol.2007 Oct, 24, (5), 391-6.
- [96]. Barış A, Bayraktar B. Hsp65 PCR-RFLP Yöntemi Kullanılarak Klinik Örneklerden İzole Edilen Mikobakteriyel Suşların Tanımlanması. Şişli Eftal hastanesi. 2020 Eyl 4, 54 ,(3), 364-370.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :

Doğum Tarihi :

E-mail :

Öğrenim Durumu	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans			
Yüksek Lisans			
Doktora			

## İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayınız)

Görevi	Kurum	Yıl

## YAYINLAR (Makaleler/Bildiriler/Ödüller)

- 1.
- 2.
- 3.