



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ve ATİPİK MİKOBAKTERİLERİN
TANIMLANMASINDA FARKLI YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ:
MALDI-TOF'UN NÜKLEİK ASİT HİBRİDİZASYON ve KLASİK
YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. ASUMAN ŞAMLI

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2014



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ve ATİPİK MİKOBAKTERİLERİN
TANIMLANMASINDA FARKLI YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ:
MALDI-TOF'UN NÜKLEİK ASİT HİBRİDİZASYON ve KLASİK
YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. ASUMAN ŞAMLI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ.DR. ZEYNEP ARZU İLKİ

İSTANBUL 2014

ÖN SÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tez çalışmamı yönlendiren, emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen, sabırla hep yanımda olan danışman hocam Doç.Dr. Arzu İLKİ'ye, değerli hocalarım; anabilim dalı başkanımız Prof.Dr. Ufuk HASDEMİR'e, Prof.Dr. Güner SÖYLETİR'e, Prof.Dr. Ayşegül KARAHASAN'a, Prof.Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU'na, Prof.Dr. Nurver ÜLGER'e ve Uz.Dr. Burak AKSU'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım süresince pek çok şey paylaştığım tezimin her aşamasında bana destek olan değerli asistan, biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın her aşamasında olduğu gibi uzmanlık eğitimim süresince de hep yanımda olan aileme; hayat arkadaşım, en büyük desteğim, en iyi dostum, sevgili eşime ve beni sabırla bekleyen canım oğluma sonsuz teşekkürler.

Dr. Asuman ŞAMLI

28 Ağustos 2014

ÖZET

Mikobakteriler insanlarda ölüm sebebi olabilen önemli mikroorganizmalardır. Mikobakterilerin hızlı ve doğru olarak tanımlanması hastalığın çabuk tedavisi için önemlidir. Bununla birlikte, mikobakterilerin zor ve yavaş üremeleri nedeniyle tanımlanmaları kolay değildir. Biyokimyasal, sekanslama ve prob metotları gibi birçok mikobakteri tanımlama yöntemi bu amaçla kullanıma girmiştir.

Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na 2012-2013 yıllarında gelen 69 mikobakteri örneği çalışmamıza dahil edilmiştir. Son yılların popüler tanımlama metodu 'Maldi Tof MS' yöntemi (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi /VITEK MS Version 2.0 system (bioMérieux)); 'Nükleik Asit Hibridizasyon (DNA Prob)' ve 'Tbc Tanımlama Testi (BD MGIT)' ile karşılaştırılmıştır. Tanımlamada altın standart olarak kullanılan klasik yöntem 'Tbc Tanımlama Testi' ile örneklerin 56 (%81)'sı *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC), 13 (%19)'ü Non Tuberculosis Mycobacteria (NTM) olarak ayrı ayrı tanımlanmıştır. Sadece NTM'leri, tür düzeyinde tanımlama açısından; Maldi Tof MS ve Nükleik Asit Hibridizasyon yöntemleri, klasik yöntem verileri esas alınarak, karşılaştırılmıştır.

Klasik yöntemle MTC ve NTM olarak tanımlanan tüm örnekler Nükleik Asit Hibridizasyon ile de aynı şekilde tanımlanmıştır. Nükleik Asit Hibridizasyonla NTM'ler tür düzeyinde de tanımlanmış ve bu yöntemle göre *M.intracellulare* (n: 5) ve *M.lentiflavum* (n: 3) en sık tanımlanan NTM türleri olmuş ve bunları sırasıyla; *M.xenopi* (n: 2), *M.malmoense*, *M.abscessus*, *M.avium* (n: 1) izlemiştir.

Maldi Tof MS ile tüm mikobakteri izolatlarının %88'i tanımlanabilmiştir. Bunlar arasında *Mycobacterium Tuberculosis Complex* üyelerinin hepsi, tür ayırımı yapılmaksızın, MTC olarak tanımlanırken; tür düzeyinde 13 adet

NTM'nin yalnızca 5 (%38.5)'i tanımlanmış ve hepsi *M.intracellulare* olarak saptanmıştır.

Maldi Tof MS'in duyarlılığının, Nükleik Asit Hibridizasyon ve Klasik yöntem ile uyumuna bakıldığında; MTC açısından, %100 uyum bulunmuştur. NTM'lerin tür düzeyinde tanımlanması açısından Nükleik Asit Hibridizasyon ile uyumun ise %38.5 gibi düşük bir düzeyde kaldığı gözlenmiştir. Kikare istatistiksel yöntemi ile Maldi Tof MS ve Nükleik Asit Hibridizasyon tanımlama yöntemleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Maldi Tof MS yöntemi ile tür düzeyinde tanımlama 45 dakika, maliyet 1 € iken; Nükleik Asit Hibridizasyon ile bu süre 6-7 saat, maliyet 30 € olmuştur.

Sonuçta; Maldi Tof MS maliyet etkin olmasına rağmen, özellikle NTM'ler için tür tanımlamada yetersiz spektrallara sahip olduğu bulunmuştur. Günümüzde; Maldi Tof MS'in, Nükleik Asit Hibridizasyon gibi moleküler yöntemlere kıyasla rutin tüberküloz laboratuvarlarında kullanım için yetersiz olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın; NTM'ler için, MTC tanımlamasındaki yüksek uyum dikkate alındığında, spektra geliştirilmesi ile yüz güldürücü sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mikobakteri, MALDI-TOF MS, Nükleik Asit Hibridizasyon

ABSTRACT

Mycobacteria may cause an important level of morbidity in humans. Rapid and accurate mycobacterial identification is important for improvement of patient outcomes. However, identification is not easy due to the slow and fastidious growth of mycobacteria. Several diagnostic methods, such as biochemical, sequencing, and probe methods, are used for mycobacterial identification.

A total of sixty nine clinical strains have been included in our study from Marmara University Hospital Mycobacteria Laboratory between 2012 and 2013. We compared 'Maldi ToF MS' (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry /VITEK MS Version 2.0 system (bioMérieux)), a popular identification method in recent years, to 'Nucleic Acid Hybridization (DNA probes)' and 'TBc Identification Test (BD MGIT)' for mycobacterial identification. By way of classical 'TBc Identification Test' method which was used as the gold standard for identification; 56 (81%) *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) and 13(19%) Non Tuberculosis Mycobacteria (NTM) were identified separately. Maldi ToF MS and Nucleic Acid Hybridization methods were compared based on the classical method data, only for NTM identification at species level in terms of effectiveness.

All samples, identified as MTC and NTM by classical method, were also identified the same by Nucleic Acid Hybridization. NTM were found at species level by Nucleic Acid Hybridization and among NTM, *M.intracellulare* (n: 5) and *M.lentiflavum* (n: 3) were the most frequently isolated species, *M.xenopi* (n: 2), *M.malmoense*, *M.abscessus*, *M.avium* (n: 1) followed these in turn.

Maldi ToF MS identified 88% of all the mycobacterial isolates. As all of *Mycobacterium Tuberculosis Complex* members were identified as MTC

without any species discrimination, only 5 of 13 (38.5%) NTM were identified at species level and all of them were *Mycobacterium intracellulare*.

Regarding the sensitivity of Maldi ToF MS in compliance with the Nucleic Acid Hybridization and Classical method, 100% compliance was observed in terms of MTC. For the identification of NTMs at the species level, compliance with the Nucleic Acid Hybridization was found as low as 38.5%. No significant difference was found between Maldi ToF MS and Nucleic Acid Hybridization methods by applying Chi-Squared test ($p > 0.05$). Maldi ToF MS method with species level identification for forty five minute is 1 €, while the Nucleic Acid Hybridization for 6-7 hours costs 30 €.

In conclusion; although Maldi ToF MS is cost effective, there is not sufficient spectra especially for NTM in identification of species. It is observed that Maldi ToF MS is insufficient compared to the molecular methods such as Nucleic Acid Hybridization for mycobacterial laboratory utilization at the present time. Whereas, it is assessed that more promising results, taking into account the high compliance of MTC identification, are expected with the development of NTM spectra.

Keywords: Mycobacteria, Maldi ToF MS, Nucleic Acid Hybridization.

ÖN SÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
ONAY	viii
KISALTMALAR	ix
TABLO VE ŞEKİLLER	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tarihçe	3
2.1.1 Tüberküloz Tarihçesi	3
2.1.2 NTM Tarihçesi	5
2.2 Epidemiyoloji	7
2.2.1 Tüberküloz Epidemiyolojisi	7
2.2.2 NTM Epidemiyolojisi	8
2.3 Mikobakterilerin Morfolojisi.....	10
2.3.1 Plazma Membranı.....	11
2.3.2 Hücre Duvarı.....	11
2.4 Mikobakterilerin Genetik ve Genel Özellikleri.....	12
2.4.1 Mycobacterium Tuberculosis Complex.....	12
2.4.2 NTM	13
2.5 Mikobakterilerin Sınıflandırılması	14
2.6 Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı	17
2.6.1 Klinik Örneklerin Alınması	17
2.6.2 Örneklerin İşlenmesi.....	18
2.6.3 Direkt İnceleme	18
2.6.4 Kültür.....	19
2.6.5 Morfolojik ve Biyokimyasal Tanımlama Testleri	21
2.6.6 Moleküler Testler	23
3.GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler	26
3.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Aletler	26
3.1.2 Kullanılan Besiyerleri.....	26
3.1.3 Kimyasal Maddeler	27
3.1.4 Kullanılan Ticari Kitler.....	27
3.2 Yöntem	27
3.2.1 Örnek Seçimi	27
3.2.2 Örneklerin Ekimi ve Üreme Takibi.....	28
3.2.3 Tanımlama Yöntemleri	29
4.BULGULAR	34

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	39
6. EKLER.....	45
7. KAYNAKLAR	46

ONAY

'*Mycobacterium Tuberculosis* ve Atipik Mikobakterilerin Tanımlanmasında Farklı Yöntemlerin Değerlendirilmesi: MALDI-TOF'un Nükleik Asit Hibridizasyon ve Klasik Yöntemlerle Karşılaştırılması' isimli çalışmamız Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'nun 01.11.2013 tarih ve 09.2013.0220 707374436-050.06.04-1300213366 sayılı kararı ile onaylanmıştır (Ek 1).

KISALTMALAR

AMS	: Açlık Mide Suyu
ARB	: Aside Dirençli Basil
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CON-C	: Conjugate Concentrate
DEN	: Denaturation Solution
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EZN	: Erlich-Ziehl-Neelsen
HIV	: Human Immunodeficiency Virus/ İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HYB	: Hibridizasyon Buffer
IS	: Insertion Sequences
INH	: İsoniyazid
LIPA	: Line Probe Assay
L-J	: Löwenstein-Jensen
MAC	: <i>M.avium- intracellulare complex</i>
MALDI-TOF	: Matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ İyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
MGIT	: Mycobacteria Growth Indicator Tube
MTC	: <i>Mycobacterium Tuberculosis complex</i>
MOTT	: Mycobacteria Other Than Tuberculosis Tüberküloz Dışı Mikobakteri
NAA	: Nükleik Asit Amplifikasyon
NAH	: Nükleik Asit Hibridizasyon
NAP	: p-nitro-Dasetilamino- β -hidroksipropiyofenon
NALC-NaOH	: N-asetil-L-sistein Sodyum Hidroksit
NTM	: Non Tuberculosis Mycobacteria
PAS	: Paraaminosalisilikasit

PBS	: Phosphate Buffer Solution Fosfat Tampon Solüsyonu
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PNM	: Primer Nukleotide Mix
RIF	: Rifampisin
RT	: Reverse Transcriptase
RIN	: Rinse Solution
STR	: Stringent Wash Solution
SUB-C	: Substrate Concentrate
TB	: Tüberküloz

TABLO VE ŞEKİLLER

TABLolar

TABLO 1. Runyon Sınıflaması	15
TABLO 2. Woods ve Washington Klinik Önemi Olan Mikobakteriler Sınıflaması	16
TABLO 3. <i>Mycobacterium Tuberculosis complex</i> Üyelerinin Biyokimyasal Özellikleri.	22
TABLO 4. İnsanlardan İzole Edilen Atıpk Mikobakterilerin Biyokimyasal Özellikleri.	22
TABLO 5. Tanımlama Yöntemlerinin Kapasitelerinin Karşılaştırılması	34
TABLO 6. NTM Türlerinin Tanımlanmasında NAH ve MALDİ TOF MS Yöntemlerinin Karşılaştırılması	35
TABLO 7. Yöntemlerin Tanımlama, Maliyet, Zaman Açısından Karşılaştırılması	37
TABLO 8. VITEK MS V2.0 (bioMérieux) ile tanımlanabilen Mikobakteri türleri.	41

ŞEKİLLER

ŞEKİL 1. Türkiye'de çok Merkezli NTM Epidemiyolojisi Çalışması	9
ŞEKİL 2. Mikobakteriyel Hücre Yüzey Yapısı	11
ŞEKİL 3. Mikobakteri İzolatının PCR Ürünlerinin Transilluminatörde Görüntüsü	30
ŞEKİL 4. Genotype Mycobacterium CM Tanımlama Kartı	31
ŞEKİL 5. MS Prosedür Basamakları	33
ŞEKİL 6. MALDI TOF MS ile MTC Olarak Tanımlanmış bir İzolatın Spektrası	36
ŞEKİL 7. MALDI TOF MS İle <i>M.Intracellulare</i> Olarak Tanımlanmış bir İzolatın Spektrası	36

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanoğlunun bilinen en eski hastalıklarından biri olan Tüberküloz (TB), tanı ve tedavideki ilerlemelere karşın bugün de tüm dünyada (özellikle Asya ve Afrika'da) önemli bir hastalık ve ölüm sebebidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün Küresel Tüberküloz 2013 Raporu'na göre dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri tüberküloz mikrobi ile enfektedir. Aynı rapora göre, 2012 yılında 8.6 milyon yeni vakanın ancak 5.7 milyonu saptanabilmiş ve 1.3 milyon kişi tüberkülozdan ölmüştür. Olguların saptama oranı 2000'de %42 iken 2012'de %66 olmuştur. Türkiye'de yılda yaklaşık 13-14 bin yeni tüberküloz hastası ortaya çıkmaktadır. Yeni tespit edilen tüberküloz hasta sayısı her yıl yaklaşık %6 oranında azalmaktadır. 2005-2006 yıllarında Türkiye genelinde yaklaşık 21.000 tüberküloz vakası varken 2012 yılında kayıtlı toplam tüberküloz vaka sayısı 14.691'e düşmüştür. TB'un sebep olduğu ekonomik kayıplar ve ölümler, bu probleme daha ciddi ve hızlı yaklaşmak gerektiğini göstermiştir. TB'un önlenememesinde tanıya geç ulaşmanın büyük payı vardır (1, 2, 3).

Yirminci yüzyılın başında *M.tuberculosis*, Mycobacterium cinsinde insanlarda hastalık yaptığı bilinen tek tür iken, daha sonraları insanlarda hastalık yapan diğer mikobakteriler bulunmuştur ve atipik mikobakteriler olarak adlandırılmışlardır. Günümüzde ise bu türlerin atipik olmadıkları kabul edilmiş ve MOTT (Mycobacteria Other Than Tuberculosis) veya Non Tuberculosis Mycobacteria (NTM/Tüberküloz Dışı Mikobakteriler) olarak isimlendirilmişlerdir. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış HIV (Human Immunodeficiency Virus/İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü) hastalarının artmasıyla fırsatçı olan ve değişik tedavi rejimlerine gereksinim duyulan NTM basillerinin etken olarak görülme sıklığında artış gözlenmesi ile tür düzeyinde tanımlanma önem kazanmıştır (4).

M.tuberculosis ve/veya NTM basilleri ile enfekte olan hastaların erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Çalışmamızda, son yıllarda bakteriyoloji laboratuvarlarına girmiş hızlı tanımlama yöntemi Maldi Tof MS'i (Matriks ile desteklenmiş lazer

desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) mikobakteri tanımlamada, altın standart olarak konvansiyonel kültür yöntemlerinden katı besiyeri (Löwenstein-Jensen, L-J) ve sıvı besiyeri (otomatize sıvı kültür yöntemi, 'Mycobacteria Growth Indicator Tube', MGIT 960) ile kıyaslarken; NTM tür tanımlama açısından duyarlılıktaki uyumuna hibridizasyon yöntemi ile bakmayı hedefledik (1). Maldı Tof MS'i, konvansiyonel kültür yöntemi ve hibridizasyon yöntemi ile maliyet ve zaman etkinliği açısından da kıyaslamaya çalıştık (5, 6, 7, 8).

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

2.1.1 Tüberküloz Tarihçesi

İnsanoğlunun M.Ö 8000 yıllarında ilk yerleşik hayata geçmesi ile birlikte mikobakteriler ile tanıştıkları tahmin edilmektedir. Almanya'da M.Ö. 5000 yıllarında insan iskeletlerinde asit dirençli basiller saptanırken, M.Ö. 3000-3500 yıllarına ait Mısır mumyaları ve Ürdün insan iskeletlerinde tüberküloz olduğu düşünülen vertebra lezyonlarına rastlanmıştır. TB hakkında ilk bilgilerin, M.Ö. 3000'de Nil Nehri kıyısında bir kasabada yaşayan ve kanlı balgam çıkararak ölen genç bir kıza ait olduğu düşünülmektedir. Hipokrat (M.Ö. 460-377) ise tüberküloz için tükenme anlamına gelen 'phtisis' terimini kullanmış ve M.S. 200 yıllarında Galen bu hastalık için tedavi önerilerinde bulunmuştur (9, 10).

Rönesans ile gelen bilimsel ilerlemelerle, A.Vesalius 1478'de phtisisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonlara rastlarken, F.Sylvius 'tüberkül' denilen sert nodüllerin bulunduğunu göstermiştir. 1600 yıllarından itibaren İngiltere'de hastalık giderek artmış, sanayi devrimi ile gelen yoksulluk, kalabalık, kötü beslenme ile 1667'de Londra'da tüm ölümlerin %25'ini tüberkülozun oluşturduğu bildirilmiştir. 17-18. yüzyılda hastalık İngiltere'den Batı Avrupa'ya oradan da tüm dünyaya yayılarak salgınları peşinde getirmiştir. 19. yüzyılın ikinci yarısında Doğu Avrupa ve Batı Asya'da, 20. Yüzyılın başlarında Uzak Doğu Asya ve Afrika'da yayılmıştır (10).

19. yüzyıl hastalığın kavranması açısından dönüm noktası olmuştur. TB tarihindeki en önemli gelişmelerden biri, 24 Mart 1882'de Berlin Fizyoloji Derneği'nde Robert Koch'un tüberkülozun '*M.tuberculosis* tarafından oluşturulan bir enfeksiyon' olduğunu kanıtlamasıdır (10). Robert Koch, tüberkülozlu hastadan bakteriyi izole etmiş ve bir kobaya vererek onunda aynı şekilde hastalandığını görmüştür. Daha sonra bu kobaydan tekrar basili

kültür yöntemi ile izole etmeyi başarmış ve bu çalışma sonucu Koch postulasını da açıklamıştır (3). Aynı yılda Paul Ehrlich boyama için anilinli suya alkolde doymuş fuksin ilave edilerek preparatın 15-30 dk. boyanmasını önermiş. Ziehl ise anilinli su yerine fenol kullanılmasını önermiştir. Neelsen 1885'de asit fenikli fuksini kullanmış ve renk gidermek için sulu sülfürik asiti önermiştir.

1895 yılında Wilhem Conrad Roentgen tarafından X ışınlarının keşfedilmesiyle akciğerlerde TB lezyonlarına ait görüntüler elde edilmiştir (23).

Robert Koch, aşı çalışmalarında başarıya ulaşmasa da, başarıya ulaşan ilk bilim adamları Albert Calmette ve Camille Guerin olmuştur. İki bilim adamı, *M. Tuberculosis*'le filogenetik olarak yakın ilişkili olan ve nadiren insanlarda, esas olarak ise sığırlarda tüberküloza yol açan *M.bovis*'in 13 yıl boyunca in-vitro kültür pasajlarını yapmışlar ve elde ettikleri avirulan basillerden (Bacillus Calmette-Guerin(BCG)) hazırladıkları aşığı 1921'de ilk kez bir çocuğa uygulamışlardır (4). 1939 yılında Florence Seibert ve Glenn, old tüberkülini saflaştırmış (PPD) bununla tüberküloz enfeksiyonunun varlığı saptanmaya başlanmışlardır (23).

Özellikle 1985 yılında, Mullis ve ark. tarafından tanımlanan polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR) yöntemi moleküler testlerin tanımlamada kullanılmasının önünü açmıştır (32). 2004 yılından sonra ise, özellikle Hettick ve arkadaşları tarafından proteomik bir yöntem olan Maldi Tof MS mikobakteri tanımlamasında yerini almaya başlamıştır (58).

20. Yüzyılın başlarında tedavi sanatoryum ve kollaps tedavisi olmuştur. Gelişmiş ülkelerde sanatoryum izolasyonu ve sosyo ekonomik gelişme ile kemoterapi bulunmadığı halde 1900'lerin başından itibaren hastalık her yıl %5-6 oranında azalmaya başlamıştır. 1950'lerde kemoterapinin hayata girmesi ile bu oran %10-14 olmuştur. Tüberküloz tedavisinde kullanılan antibiyotiklerden ilki streptomisin 1944'de

bulunmasının ardından sırası ile paraaminosalisilikasit 1946'da, izoniyazid 1952'de, pirazinamid 1954'de, etambutol 1962'de ve rifampisin 1966'da bulunmuştur (11).

Ülkemizde TB ile ilgili ilk çalışmalar, Osmanlı döneminde Sultan Abdülhamit tarafından İstanbul ve İzmir'de yapılmıştır. İlk dispanser, 'Veremle Mücadele Osmanlı Cemiyeti' adı altında Haziran 1918 tarihinde İstanbul'da açılmıştır (12). O dönemde ölüm nedenleri arasında TB'a bağlı ölüm oranı %15.8 olarak bildirilmiştir. Daha sonra, Prof.Dr. Tevfik SAĞLAM tarafından 1949 yılında İstanbul'da 'Ulusal Verem Savaş Derneği' kurulmuştur (9). Doksanlı yıllarla birlikte 'Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz' alanında bilimsel dernek örgütlenmeleri gerçekleşmiş ve bilimsel çalışmalar, mesleki eğitimler yapılmaya başlanmıştır. Türkiye'de hastalığın kontrol altına alınması amacıyla 1953 yılında BCG aşı kampanyalarına başlanmıştır (13).

1970'lerde hastalığın bazı ülkelerde eradike edileceği düşünülürken, 1980'lerde HIV vakalarının artışı ve çoklu ilaç direnci sorununun ortaya çıkması ile 1985'ten itibaren tekrar bir artma yaşanmıştır. DSÖ tarafından erken tanı, tedavi ve aşılınmayı içeren tüberküloz kontrol programı uygulaması başlatılmıştır. Yine DSÖ tarafından Nisan 1993'te yapılan açıklamada dünyanın çoğu bölgesinde artık tüberkülozun önlenemez hale geldiği ve acil durum oluşturulması gerektiği duyurulmuştur (10).

2.1.2 NTM Tarihçesi

Yirminci yüzyılın başında *M.tuberculosis*, Mycobacterium cinsinde insanlar için hastalık yaptığı bilinen tek türken, özellikle HIV hastalarının artmasıyla diğer mikobakteri türlerinin de hastalık yapabileceği anlaşılmaya başlanmıştır. Bu mikobakterilerin seyir ve tedavi prensiplerinin farklı olması türlerin tanımlanmasını ve sınıflandırılmasını mecburi kılmıştır.

Ernest Runyon 1950'lerin sonlarında, *M.tuberculosis* ve *M.bovis* dışındaki mikobakterileri; üreme hızına, pigment üretimine, koloni morfolojisine göre; 'fotokromojen, skotokromojen, non-fotokromojen ve hızlı

üreyenler' olarak 4 gruba ayırmıştır. Sonra bu sınıflama yetersiz kalmış, hücre yapısı ve genetik bilgiler arttıkça, Woods ve Washington tarafından 1987'de klinik önem kazanan diğer mikobakterileri de içine alan klinik içerikli, genetik yaklaşımla uyumlu bir sınıflamaya gidilmiştir. Bu sınıflamada, 'insan ve sıcakkanlı hayvanlara patojen türler, insana potansiyel patojen türler, insana nadiren patojen saprofitik türler' olarak ayrılmıştır. Günümüzde iki sınıflama da kullanılabilir (4).

İlk kez 1979 yılında Denver'da uluslararası bir konferansta NTM'lerle ilgili çalışmalar derlenmiş ve bu bakterilerin epidemiyolojisi, patojenitesi, taksonomisi, moleküler genetiği hakkında ilk kanıtlar ortaya konmuştur ve moleküler kanıtlar sınıflamalarda yerini almıştır (21).

NTM türlerinin adlandırılmasında da bir dizi tarihsel dönem geçirilmiştir. Bu konudaki ilk çabalar 1935 yılında Pinner'e ait olup, mikobakterilere 'atipik aside dirençli bakteriler' demiştir (14, 15).

Wayne ve Sramek 1992'de 'Mycobacteria other than tubercule bacilli' ve 'nontuberculous' terimlerinin tam doğru olmadığını çünkü bazı atipik türlerin akciğerde tüberkül oluşturduğunu savunmuşlardır. Bu tartışmadan sonra MOTT terimi 'Mycobacteria Other Than Tubercule Bacilli' yerine 'Mycobacteria Other Than *M.tuberculosis complex*' olarak kullanılmıştır. Piersimoni 2000 yılında 'Journal of Clinical Microbiology'de yayınlanan yazısında MOTT olarak 'Mycobacteria Other Than Tuberculosis' tanımını tercih ettiklerini ifade etmişler ve son yıllardaki yayınlarda da bu ifade kullanılmıştır (14, 16, 17).

2.2 Epidemiyoloji

2.2.1 Tüberküloz Epidemiyolojisi

TB hasta sayılarındaki artışlar ve TB kontrolü çabalarında yeterince başarı sağlanamaması nedeniyle DSÖ, 1993 yılında TB için acil durum ilan etmiştir (10, 18). DSÖ'nün 2013 raporuna göre dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ü TB basili ile enfektedir (2). Daha önce *M.tuberculosis* ile karşılaşmış HIV pozitif bir insanda TB gelişme riski 10 kat artmış olup bu oran %50 kadardır. HIV epidemisi yayıldıkça ilaçlara dirençli tüberküloz sorunu da artmaya başlamıştır (19). Tüberküloz dünyadaki tüm ölümlerin %7'sinden ve gelişmekte olan ülkelerdeki önlenebilir yetişkin ölümlerinin %26'sından sorumludur. Tüm dünyadaki mevcut hastaların %95'i gelişmekte olan ülkelerde olup, ölenlerin %98'i yine bu ülkelerde gerçekleşmektedir. En çok yeni tanı konulan ilk beş ülke sırasıyla Hindistan, Çin, Güney Afrika, Nijerya ve Endonezya olarak bildirilmiştir. Dünyadaki tüberküloz vakalarının yaklaşık %40'ı Hindistan ve Çin'de bulunmaktadır (3, 20).

Türkiye'de yılda yaklaşık 13-14 bin yeni tüberküloz hastası ortaya çıkmaktadır. Yeni tespit edilen tüberküloz hasta sayısı ise her yıl yaklaşık %6 oranında azalmaktadır. 2005-2006 yıllarında Türkiye genelinde yaklaşık 21.000 tüberküloz vakası varken 2012 yılında kayıtlı toplam tüberküloz vaka sayısı 14.691'e düşmüştür. Hastaların %59'u erkek, %41'i kadındır. Hastaların %64'ünde akciğer tüberkülozu varken, %36'sında akciğer dışındaki organlar tutulmuştur. TB'un sebep olduğu ekonomik kayıplar ve ölümler bu probleme daha ciddi ve hızlı yaklaşmak gerektiğini göstermiştir (1, 2, 3).

2.2.2 NTM Epidemiyolojisi

İlk kez 1979 yılında Denver’da uluslararası bir konferansta NTM’lerle ilgili çalışmalar derlenmiş ve bu bakterilerin epidemiyolojisi, patojenitesi, taksonomisi, moleküler genetiği hakkında ilk kanıtlar ortaya konmuştur.

Son yıllarda tüberküloz insidansı düşük olan ABD ve Avrupa ülkelerinde NTM ile oluşan enfeksiyonların miktarında HIV ile birlikte artma tespit edilmiştir. Tüberküloz insidansı yüksek olan Afrika ve gelişmekte olan ülkelerde ise HIV hastalarının NTM insidansı düşük görülmüştür. Muhtemelen bu hastalar NTM enfeksiyonu gelişmeden başka sebeplerden ölmüşlerdir (21).

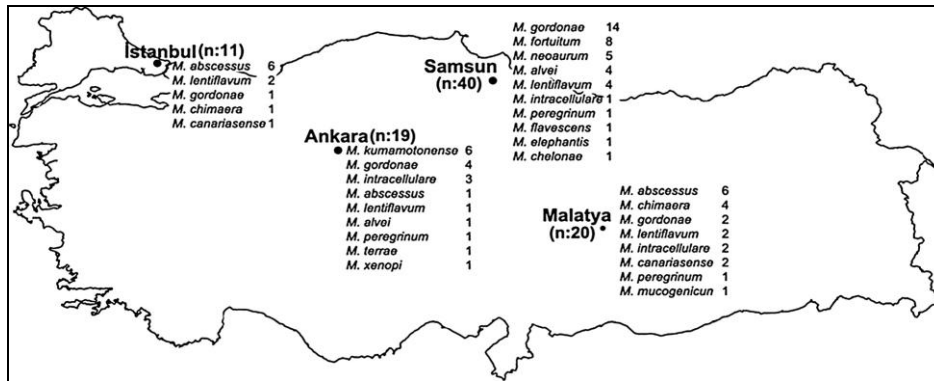
NTM’ler suda, toprakta, doğada bulunabilirler. Avrupa ve ABD hastanelerinde sıcak-soğuk su sistemlerinde ve hastanede kullanılan ekipmanlarda yapılan sürvelans çalışmalarında *M.xenopi*, *M.avium* saptamışlardır. Bunlar kolonizasyona yol açarak, bağışıklık sistemi çökmüş insanlarda ciddi hastalıklara, nazokomiyal salgınlara neden olabilmektedirler. Özellikle hızlı üreyen ve dezenfektanlara dirençli olan mikobakterilerin daha sık salgınlar yaptığı ve kontrollerinin zor olduğu gözlemlenmiştir (22).

Mikobakteri enfeksiyonlarının %0.5-35’i NTM’ler oluşturmaktadır ve insidansında her yıl %8-9 artış olduğu tespit edilmiştir. NTM’nin genel epidemiyolojisi ile ilgili yapılan çeşitli araştırmalarda MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare complex*), *M.kansasii* klinik izolatlardan en sık izole edilen mikobakteriler olmuştur (22). Örneğin: İngiltere’de Moore JE ve arkadaşları yaptığı çalışmada MAC’i %61 ve *M.fortuitum*’u %19 (24), Jarzembowski JA. ve arkadaşları ABD’de yaptığı araştırmalarda sıklıkla MAC’i izole etmişlerdir. MAC, *M.kansasii* ve *M.fortuitum* %85 ile Kanada’da (21), *M.chelonae* %26.7 ile Hong-xiu ve arkadaşlarının çalışmalarında Çin’de en çok izole edilmiştir (25). Tayvan’da *M.abcessus* %31 ve MAC %29 ile (26), Hong Kong ‘da MAC %52 ile sıkça saptanmışlardır (27).

Ülkemizde de NTM epidemiyoloji açısından çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Klinik örneklerden yapılan bu araştırmalardan; Ankara’da Bedir ve arkadaşları 17 NTM’den en çok *M. gordonae* (%65), Hacettepe

Üniversitesi'nde Engin ve arkadaşları klinik örnekler arasında 22 adet NTM içinden en sık *M. gordonae* (%50) izole etmişlerdir. Mersin Üniversitesi'nde, Bayram ve arkadaşları 7 adet NTM klinik örnekten hepsini *M. fortuitum*, Ege Üniversitesi'nde Çavuşoğlu ve arkadaşları 19 örnekte en sık olarak *M. fortuitum* (%57.9), Uzun ve arkadaşları 11 adet NTM örneğinde en çok *M. fortuitum* izole etmişlerdir (22, 28, 29, 30).

Çok merkezli 2001 ve 2008 yılları arasında %44.4 Samsun 19 Mayıs Üniversitesi'nden, %21.1 Ankara Refik Saydam'dan, %22.3 Malatya İnönü Üniversitesi'nden, %12.2 İstanbul Üniversitesi'nden toplam 90 klinik örnekten elde edilen NTM ile çalışılmışlar, en sık *M.gordonae* (%32.3), ve en az *M. flavescense*, *M.mucogenicum*, *M.chelona*, *M.elephantis*, *M.terrae*, *M.xenopi* (%1.1) türlerini izole etmişlerdir. Bölgelere göre ise, İstanbul'da *M.abscessus* (%54.5), Ankara'da *M.kumamotoense* (%31.6), Samsun'da *M.gordonae* (%35), Malatya'da *M.abscessus* (%22.5) daha yaygın olarak raporlanmıştır (Şekil 1) (22).



Şekil 1. Türkiye'de çok merkezli NTM Epidemiyolojisi Çalışması (2001-2008)

2009 Ocak-2010 Aralık tarihleri arasında ise Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı, mikobakteri tür tayini için gönderilen NTM izolatlarının %33.3 *M.fortuitum* olarak tanımlarken, bunu %18.7 ile *M.abscessus* izlemiştir (5).

2.3 Mikobakterilerin Morfolojisi

Mycobacterium cinsi, Corynebacterium ve Nocardia ile birlikte 'Actinomycetales' takımında sınıflandırılmış, 'Mycobacteriaceae' ailesinde yer alan tek cinstir (1, 4). Mycobacterium cinsinin tüm üyeleri aerop, katalaz üreten, hareketsiz ve spor oluşturmeyen bakteriler olup, diğer bakterilerden belirgin olarak küçüktürler; enleri 0.2-0.6 µm, boyları 1-10 µm arasında değişmektedir. Görünüm olarak hafif kıvrık veya düzgün çomak şekilli bakteriler olup, kültürlerden hazırlanan direktlerde dallanmış filamentoz formda görülebilirler. Patojen basillerin hidrofobik karakterleri sebebi ile birbirlerinden ayrılmadan büyük kümeler şeklinde çoğaldıkları görülmüş, bu kümeler kord faktör (serpentine cord) olarak tanımlanmıştır (4).

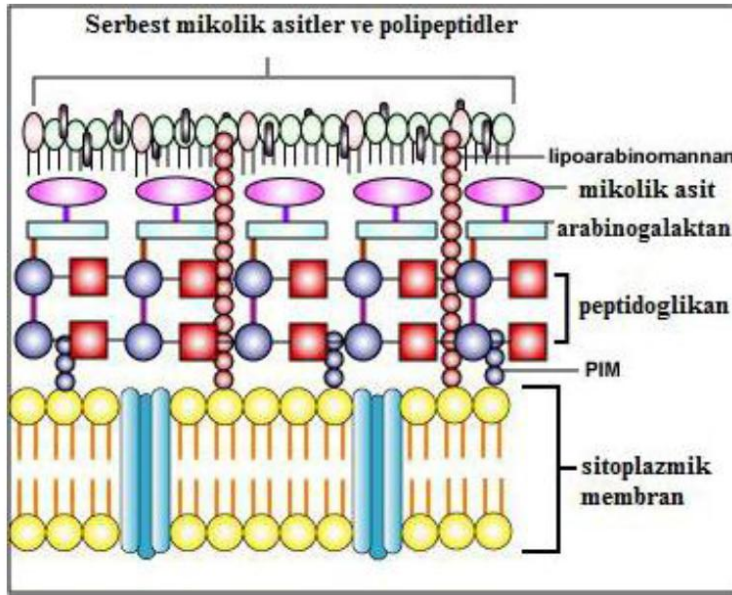
Mikobakterilerin avirulan türleri birbirine yapışık olmayan paralel formda ürerler. Kord faktör oluşturma daha çok MTC'e özgü bir özellik olarak kabul edilmekle beraber morfolojik görünüm, tür tayini veya patojenite için bir prediktif bulgu değildir (31, 32). NTM'ler *M.tuberculosis*'ten ekoloji ve fizyoloji açısından farklıdır. *M.tuberculosis* insan ve diğer sıcakkanlı hayvanlarda gözlenirken, NTM'ler doğal çevrede yaygın olarak bulunur ve çoğu dezenfektanlara dirençli olmaları sebebi ile içme suyu şebekelerinde de yaşayarak nazokomiyal enfeksiyonlara sebep olabilirler (32).

Mikobakteriler hücre duvarlarında peptidoglikan bulunması sebebi ile gram pozitif bakterilere benzeseler de, gram boyama yapılsa nadiren zayıf gram pozitif olarak boyanırlar. Genellikle koloni morfolojileri türler arasında çeşitlilik göstermekte olup; S (smooth) tipi, R (rough) tipi, pigmentli (kromojenik), pigmentsiz (nonkromojenik) gibi değişen morfolojide kolonileri vardır. Üremeleri için gerekli en uygun ısı dereceleri ve pH'ları türler arasında değişkenlik göstermektedir. Örneğin MTC'ler pH: 6.5-6.8'de ve aerop ortamda ürerken, MAC ph 5.5'de mikroaerofibik ortamda üreyebilir. MTC 37 °C de iyi ürerken *M.malmoense* 45 °C'de iyi üremektedir (4, 33, 34).

2.3.1 Plazma Membranı

Mikobakteriler stoplazma, stoplazma membranı ve lipidlerden zengin hücre duvarından oluşmuştur.

Plazma membranının, protein ve fosfolipidlerden oluşan çift katmanlı bir yapısı vardır. Bu hali ile diğer bakterilere benzemekle beraber, lipoaraminomannan, lipomannan ve fosfotidilinozitol mannozid taşımaları ile onlardan ayrılırlar (Şekil 2) (4).



Şekil 2. Mikobakteriyel hücre yüzey yapısı

2.3.2 Hücre Duvarı

Sitoplazmik membranın hemen üstünde hücrenin şeklini ve rijiditesini sağlayan peptidoglikan (mürein) tabakanın yapısında, N-asetil glikozamin ve N-glikolil muramik asit yer alır. Glikolil yapısı nedeniyle bakteri lizozime dirençli hale gelir. Peptidoglikan üzerinde ise arabinogalaktan polimeri bulunur. Peptidoglikandaki muramik asit ve arabinogalaktandaki arabinoz arasında kurulan fosfodiester bağlar ile birbirine bağlanırlar (35, 36). Arabinogalaktan tabaka, hücre duvarı kuru ağırlığının %25-35'ini oluşturur. Bu tabaka sayesinde hücre geçirgenliği engellenir, mikobakteriler konakta uzun süre canlılığını korur, hidrofobik antibiyotiklere geçirgenliği azalır ve

kimyasal ajanlara ve dehidratasyona karşı dirençli bir mikroorganizma olarak karşımıza çıkar. Bunun üzerinde mikolik asit taşınır ve mikolik asit hücre duvarının en önemli lipiti olup aside dirençli boyanmadan sorumludur (4). Boyayı zor alırlar; ancak bir defa boyandıklarında boyayı kolay bırakmaz ve asit-alkol karışımı ile yapılan dekolorizasyona direnç gösterirler. Bu nedenle aside dirençli bakteriler (ARB, Asido Rezistan Bakteri) olarak adlandırılmışlardır. Yüzey lipitlerinin hidrofobik etkileri, boyanın suda kolay eriyen organik bir madde (fenol) içinde eritilmesi ve ısıtılması ile en aza indirilir (16, 33).

En dış tabaka ise, serbest lipitlerin yer aldığı bölümdür. Balmumu yapısındaki maddeler, kord faktör ve türe özgü mikozitler burada bulunurlar. Kord faktör *M.tuberculosis* virulansında görev alan en önemli faktörlerden biridir. Hücre duvarında yağ tabakasının da dışında polipeptidler hastada hücrel immün yanıtın gelişimine olarak sağlar (Şekil 2).

2.4 Mikobakterilerin Genetik ve Genel Özellikleri

2.4.1 *Mycobacterium Tuberculosis Complex*

Mycobacterium tuberculosis complex (MTC) içindeki türler %85'in üzerinde DNA-DNA homolojisi göstermektedir. 16S rRNA'ları aynıdır ve 16S-23S rRNA gen dizilimindeki boşluklar aynı yerlerde. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv standart kökeninin tüm genom diziliminin belirlenmesi mikobakteriler için önemli bir gelişme olmuştur.

Türler arası ayırım hastalığın epidemiyolojisi açısından önem taşımaktadır. Geliştirilen moleküler teknikler sayesinde *M.tuberculosis complex* içindeki '*insertion sequences* (IS), *short repetitive DNA*' sekansları gibi tekrarlayan DNA bölgelerinde poliformizm olduğu gösterilmiştir. Özellikle IS6110 bölgesi genomdaki kopya sayısının yüksekliği nedeniyle, genetik polimorfizmi saptamak için en çok kullanılan belirteç olmuştur (4).

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA homolojileri yönünden benzerlik gösteren türler kompleks tanımı altında toplanmıştır. *M.tuberculosis complex*;

M.bovis ve BCG suşu, *M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti*, *M.pinnipedii*, *M.caprae* ve *M.mungi*'den oluşturmaktadır (16, 31, 37, 38, 39).

MTC üyeleri, Mycobacterium cinsinin iki karakteristik özelliğine sahiptir; yavaş üreme hızı ve asit-alkol dekolarizasyonuna gösterdiği direnç. Kompleks üyelerinin hepsinin bölünme zamanı yaklaşık 20 saat olup besiyerinde gözle görünür koloni oluşturmaları için geçen süre 3-4 haftadır. L-J besiyerinde tipik olarak pürtüklü, sert koloniler oluşturur (4, 33).

Klinik örneklerden primer kültürde üreme süreleri sekiz haftaya kadar uzayabilir. Bu süre sıvı besiyerlerinde daha kısadır. Üreme için gerekli optimal pH: 6.5-6.8, optimal ısı 37°C'dir. Ortam havasında %5-10 CO₂ bulunması mikobakterilerin üremesini artırır. Ortamdaki p-nitro-Dasetilamino-β-hidroksipropiyofenon (NAP) *M.tuberculosis complex*'in üremesini inhibe eder (16).

2.4.2 NTM

Yavaş üreyen mikobakteriler diğerlerinden farklı olarak, daha az sayıda rRNA genine sahiptirler. 16S, 23S, 5S rRNA geninden sadece tek bir kopya içerirken, buna karşı tek kopya içeren *M.chelonae*, *M.abscessuss* haricindeki hızlı üreyen mikobakterilerde çift gen kopyası olduğu gösterilmiştir. Buradan rRNA geninin ürettiği proteinlerin üreme hızını etkilediği düşünülmektedir (40).

Atipik mikobakteriler doğada yaygın bulunur, insanda genellikle kolonize olur ve insandan insana yayılımı azdır. NTM ile karşılaşmış olmak patojen olan türler için yapılan deri testini etkileyerek pozitif yapabilmektedir. Ayrıca NTM'ler ilk inkübasyon esnasında %10 CO₂ ihtiyaç duyabilirler. Genelde optimal üreme ısısı 35-37°C ise de deri ve yüzeyel enfeksiyon yapan türlerde bu değer 25-33°C olarak belirlenmiştir (4).

NTM tedavi prensibi, tüberkülozdan farklı olduğu için klinikte türe özgü tanılarının konması önem taşımaktadır. Örneğin: *M.kansasii*, akciğere yerleşir, tüberküloz ilaçları ile tedavi edilebilir. *M.marinum*, akvaryumla uğraşanlarda cilt enfeksiyonu yapar, çoğu INH ve streptomisine dirençlidir.

M.scrofulaceum, çocuklarda servikal lenfadenite neden olan antitüberküloz ilaçlarına dirençli bir türdür. *M.gordanae*, sulara izole edilen, bir çok organda enfeksiyon yapan türlerdendir. *M.xenopi*, optimal üreme ısısı 42°C ve kuşlar doğal rezervuarı olup, hastane su depolarından, musluk sularından izole edilen bir tür olup, antibiyotik direnci değişkendir. *M.ulcerans*, Avustralya-Amerika'da endemik olan, bacakta travma sonucu deri lezyonu yapan bir türdür ve tedavisi cerrahi ile beraber dapson ve streptomisindir.

M.avium-intracellulare complex (MAC), *M.avium* ve *M.intracellulare* biyokimyasal ve antijenik olarak benzer olduklarından MAC olarak adlandırılmışlardır. CD4 hücre sayısı 200/mm³ altına inmiş HIV hastalarında enfeksiyona neden olurlar. Tedavide klaritromisin, rifabutin, etambutol kombine tedavisi uygulanır. İzonyazitin MAC tedavisinde yeri yoktur.

Hızlı üreyen türlerde en çok *M.fortuitim-chelonei complex*'i, ve *M.abcessus* insanda enfeksiyon oluşturabilir. Dekontaminasyon yöntemlerinden NaOH bu bakterilere toksik etki yaparlar. Hastanedeki invaziv girişimler sonucu sıklıkla görülürler. İlaçlara dirençleri değişiktir (4).

2.5 Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Mycobacterium cinsi, yüksek G+C içerikli gram pozitif bakterilerin içinde, Corynebacterium ve Nocardia ile birlikte, Actinomycetales takımında sınıflandırılmış olup Mycobacteriaceae ailesinde yer alan tek cinstir (33). Genus içinde insanlar için patojen (*M.leprae*, *M.tuberculosis*), potansiyel patojen (*M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.xenopi*, *M.fortuitum*, *M.chelonae*) ve saprofit (*M.gordonea*, *M.gastri*, *M.flavescens*) gibi türler bulunmaktadır (16).

Mikobakterilerin sınıflandırılmasında günümüzde iki tür sınıflandırma kullanılmaktadır. Bunlar;

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

- Grup I Fotokromojenler: Sadece ışıpta sarı portakal rengi pigment oluşturan mikobakteriler (*M.kansasi*, *M.marinum*),
- Grup II Skotokromojenler: Karanlıkta portakal rengi veya kırmızı pigment oluşturan mikobakteriler (*M.scrofulaceum*, *M.szulgai*, *M.gordonae*),
- Grup III Nonfotokromojenler: Pigment oluşturmeyan mikobakteriler (*M.avium-intracellulare*, *M.terrae*, *M.xenopi*),
- Grup IV Hızlı Üreyenler: Üremek için bir haftadan daha az bir süreye gereksinim duyan çabuk üreyen mikobakteriler (*M.fortuitum-chelonae complex*, *M.peregrinum*, *M.abscessus*) (35) (Tablo 1).

Tablo 1. Runyon sınıflaması

Runyon Grup I: Fotokromojenler	Runyon Grup III: Non-fotokromojenler
<i>M. kansasi</i>	<i>M.avium-intracellulare</i>
<i>M.marinum</i>	<i>M.molmoense</i>
<i>M.simiae</i>	<i>M.haemophilum</i>
<i>M.asiaticum</i>	<i>M.genavense</i>
<i>M.intermedium</i>	<i>M.ulcerans</i>
	<i>M.shimoidei</i>
	<i>M.celatum</i>
	<i>M.branderi</i>
Runyon Grup II: Skotokromojenler	Runyon Grup IV: Hızlı Üreyenler
<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M.fortuitum</i>
<i>M.xenopi</i>	<i>M.chelonae</i>
<i>M.szulgai</i>	<i>M.abscessus</i>
<i>M.gordonae</i>	<i>M.mucogenicum</i>
<i>M.flavescens</i>	<i>M.peregrinum</i>
<i>M.lentiflavum</i>	
<i>M.interjectum</i>	

2. Woods ve Washington sınıflandırması: 1987'de klinik önem kazanan diğer mikobakterileri de içine alan klinik ve moleküler uyumlu bir sınıflandırma yapmışlardır:

- İnsan ve sıcakkanlı hayvanlara patojen türler,
- İnsana potansiyel patojen türler,
- İnsana nadiren patojen saprofitik türler (Tablo 2).

Tablo 2. Woods ve Washington klinik önemi olan mikobakteriler sınıflaması

İnsan ve diğer sıcakkanlı hayvanlarda türler	İnsanda nadiren hastalık yapan saprofitik türler
<p><i>M.tuberculosis complex</i></p> <p><i>M. tuberculosis</i>- insanda</p> <p><i>M.bovis</i>- sığır ve nadiren insanda</p> <p><i>M.africanum</i>- Afrika'da insanda yaygın</p> <p><i>M.microti</i>- kemiricilerde</p> <p><i>M.lepra</i></p>	<p><u>Yavaş üreyen</u></p> <p><i>M.gordonae</i></p> <p><i>M.asiaticum</i></p> <p><i>M.terrae-triviale complex</i></p> <p><i>M.shimodei</i></p> <p><i>M.gastri</i></p> <p><i>M.nonchromogenicum</i></p> <p><i>M.paratuberculosis</i></p>
<p>İnsanda potansiyel patojen</p> <p><i>M.avium intracellulare complex (MAC)</i></p> <p><i>M.kansasii</i></p> <p><i>M.fortuitum-chelonae complex</i></p> <p><i>M.scrofloceum</i></p> <p><i>M.xenopi</i></p> <p><i>M.szulgai</i></p> <p><i>M.malmoense</i></p> <p><i>M.simiae</i></p> <p><i>M.genavense</i></p> <p><i>M.marinum</i></p> <p><i>M.ulcerans</i></p> <p><i>M.haemophilum</i></p> <p><i>M.celatum</i></p>	<p><u>Hızlı üreyen türler</u></p> <p><i>M.thermoessistible</i></p> <p><i>M.smegmatis</i></p> <p><i>M.vaccae</i></p> <p><i>M.parafortuitum complex</i></p> <p><i>M.phlei</i></p> <p><u>Orta hızda üreyen</u></p> <p><i>M.flavescens</i></p>

2.6 Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı

Tüberküloz kesin tanısı mikrobiyolojik olarak, klinik örneklerde tüberküloz basilinin gösterilmesi ile konur. Günümüzde Mikobakterilerin tanısında; mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Mikobakteriyoloji laboratuvarlarının tanı ve tedaviye katkısı; mikobakterinin saptanması, identifikasyonu, tür tayini ve üretilen basilin ilaç duyarlılığının saptanmasıyla olmaktadır (1, 41).

2.6.1 Klinik Örneklerin Alınması

Tüberküloz tanısı için klinik örneklerin alınma, laboratuvara gönderilme ve işlenmesinde belirli kurallar vardır. Örnekler steril, sızdırmaz burgulu kapaklı ve tek kullanımlık kaplar içine, yeterli miktarda alınmalıdır (42).

Pulmoner örnekler içinde; balgam, Bronkoalveoler Lavaj (BAL), bronşial fırçalama, transtrakeal aspirat, Açlık Mide Suyu (AMS) örnekleri sayılabilir. Balgam en sık tercih edilen örnek türüdür ve birbirini izleyen 3 ayrı günde 5-10 ml sabah balgamı alınması tercih edilir. BAL invaziv bir örnektir. En az 5 ml alınmalıdır (33, 39). Açlık mide suyu, tüberküloz olduğu radyolojik olarak kanıtlanmış balgamı negatif olan hastalarda, bebek- küçük çocuk- koma hali gibi durumlar nedeniyle balgam çıkaramayan hastalarda tercih edilebilir. Birbirini takip eden 3 gün boyunca, sabah açken alınmalıdır (33, 39).

Ekstrapulmoner örnekler; idrar, steril vücut sıvıları, apse, dışkı ve doku örnekleridir. İdrar örnekleri birbirini izleyen en az 3-5 gün süre ile, sabah ilk ve orta akım idrarı olacak şekilde alınmalıdır. Örnek miktarı en az 40 ml olmalı, yirmi dört saat biriktirilen veya torbadan alınan idrarlar kabul edilmemelidir. Steril vücut sıvıları; Beyin Omurilik Sıvısı (BOS), plevra, perikard, periton veya sinovyal sıvılardır. BOS hariç bu örnekler mümkün olduğunca fazla olmalı, 5 ml'den az olmamalıdır. BOS örnekleri en az 2-3 ml alınmalıdır. Apsel örnekleri aseptik koşullarda alınmalı, mümkün olduğu kadar

çok materyal aspire edilmelidir. Doku örnekleri, steril bir kap içine eğer mümkünse en az bir gram olacak şekilde alınmalıdır. Dışkı örnekleri MTC için değil, HIV'li hastalarda MAC tanısına yardımcı olabileceği için tercih edilebilir ve en az bir gram olmalıdır (33).

2.6.2 Örneklerin İşlenmesi

Mikobakterilerin izolasyonu için, klinik örneklerin organik (lökosit, eritrosit, doku gibi) kalıntılarından arındırılması için homojenizasyon/dekontaminasyon ve bakteri yoğunluğunu arttırmak için konsantrasyon işlemi uygulanır.

Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işleminde en sık N-Asetil-L-Sistein + Sodyum hidroksit (NALC- NaOH) ve %3-4'lük Sodyum hidroksit (NaOH) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bunların dışında, zefiran-trisodyum fosfat, oksalik asit, asetilpridinyum klorid, sodyum klorid gibi farklı yöntemler de vardır (33, 37, 42, 43).

2.6.3 Direkt İnceleme

Mikroskopik inceleme en kolay, en ucuz, en sık kullanılan ve tanısal değeri oldukça yüksek bir yöntemdir. Boyanmış yayma preparatlarının mikroskop ile incelenmesi, aside dirençli basil (ARB) aranmasında ilk aşamadır. Direkt mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için, örnekte 5.000–10.000 basil/ml olması gerekmektedir. Mikobakterilerin kültürde üremesi için ise 10-100 basil/ml olması yeterlidir. Bu da direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığının daha düşük olmasını ve kültürün önemini açıklamaktadır (1, 44). Ancak kültürün pozitifleşmesi en kısa 10-15 gün almaktadır. Bu durumda yaymada ARB saptanması, klinik örnekte mikobakteri varlığını gösteren ilk bakteriyolojik kanıttır. Bu amaçla iki tip aside dirençli boyama kullanılmaktadır;

1. Karbol fuksin (Ehrlich Ziehl-Neelsen ve Kinyoun): Karbol fuksin boyama metotlarının duyarlılığı %22-80'dir. En sık kullanılan karbol fuksin

metodu Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) metodudur. Bu yöntemde, kaynamayacak şekilde alttan ısıtma ile preparat hazırlanır (16).

Kinyoun boyama yöntemi EZN yöntemine benzer, fakat kullanılan karbol fuksin ve fenol konsantrasyonu artırılarak, ısıtma işlemini gereksiz kılan modifiye bir boyama yöntemidir (soğuk karbol fuksin boyama) (34).

2. Florokrom Boyama (Rhodamine-Auramine): Florokrom boyama metotlarının duyarlılığı %52-97'dir. En sık kullanılan florokrom boyama metodu ise auramin-rodamindir. Bu metotta 40x büyütme yeterlidir (15). Florokrom boyamada ana ilke fenollü fuksin yerine floresan boyaların, mikobakterilerin lipitten zengin hücre duvarına bağlanarak, görünür hale gelmesini sağlamaktır (4). Bu yöntemin duyarlılığının yüksek olmasına karşın özgüllüğü düşüktür. Bu nedenle pozitif yaymaların, karbol fuksin boyama yöntemi ile doğrulanması önerilir (33, 42).

2.6.4 Kültür

Mikobakterilerin tanısında, kültür direkt mikroskopiden daha duyarlı olması, tür tayini ile antimikrobiyal duyarlılık testlerine olanak sağlaması sebebiyle altın standarttır. Mikobakterilerin L-J'da üretilmesine dayanan kültür yöntemleriyle tanıya ulaşmak için 6-8 hafta gibi bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, hızlı kültür yöntemleri geliştirilmiştir. Hızlı kültür yöntemleri ile mikobakteri üreme süresi ortalama 10-15 gün almaktadır. Yapılan çalışmalarda hızlı kültür sistemleri ile L-J'nin beraber çalışılmasının izolasyon oranını %100'lere çıkardığı gösterilmiştir. Bu sebeple Dünya Sağlık Örgütü de tanıda katı besiyerine ilaveten hızlı kültürün de eklenmesini önermektedir (1).

Katı özellikteki besiyerleri yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki çeşittir:

1. Yumurta Bazlı Besiyerleri: En yaygın kullanılanı Löwenstein-Jensen (L-J) besiyeridir. L-J besiyerinin tercih edilme nedenleri arasında uzun ömürlü

olmaları, tipik koloni morfolojisi oluşturmaları, içerdikleri malaşit yeşili sayesinde kontaminant bakterileri engellemeleri ve ekonomik olmaları gibi nedenler sayılabilir. Ancak tipik kolonilerin geç oluşması ve ilaç duyarlılık testleri için dengeli konsantrasyonların sağlanamaması dezavantaj olarak saptanmıştır.

2. Agar Temelli Besiyerleri: Yumurtalı besiyerlerinin aksine şeffaftır. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar bazlı besi yerleridir. Yumurtalı besiyerlerinde 18-24 günde saptanan koloniler, agar temelli besiyerlerinde 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görülebilmektedir.

Mikobakterilerin izolasyonunda kullanılan sıvı besiyerleri katı besiyerlerine göre daha kısa sürede (7-14 gün) sonuç verirler. Ancak koloni morfolojilerinin görülememesi, çabuk bozulmaları ve pahalı olmaları dezavantajlarıdır. Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albumin besiyerleri en sık kullanılan sıvı besiyerleridir (33).

Hızlı kültür sistemleri de tanıda önemli yer tutmaktadır. Çoğunda sıvı besiyeri kullanılmakla birlikte, bifazik ve katı besiyerlerinin kullanıldığı sistemler de mevcuttur ve bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı fluorometrik veya kolorometrik olarak ölçülür. BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Sparks, MD), BACTEC MGIT 960 (BD Biosciences, Sparks, MD), VersaTREK (Trek Diagnostics, Inc., Ohio), BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France) mikobakterilerin tanısı için geliştirilmiş ticari, otomatize kültür sistemlerinden bazılarıdır (43, 45).

BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Sparks, MD): Yarı otomatize, radyometrik, sıvı bazlı ticari bir kültür sistemidir. Besiyerlerinde substrat olarak bulunan radyoaktif karbon işaretli palmitik asitin mikobakteriler tarafından kullanılması sırasında oluşan ¹⁴CO₂ atomunun BACTEC 460 TB cihazında 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve yarı otomatize olması sistemin dezavantajlarıdır (43, 45, 46).

BACTEC MGIT 960 (BD Biosciences, Sparks, MD): Kültür tüplerinin inkübasyonunun cihaz içinde gerçekleştiği ve üreme kontrolünün otomatik olarak yapıldığı, radyometrik olmayan tam otomatize ticari hızlı kültür sistemidir (33). BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde (BBL MGIT 7ml tüp), Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Kullanılan besiyerlerinde mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışığına karşı floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı üreme indeksi (GI) olarak değerlendirilmektedir. Bu sistem kan hariç tüm örnekler için uygundur (33, 47).

VersaTREK (Trek Diagnostics, Inc., Ohio): Selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve selüloz sünger içeren tam otomatize bir sistemdir. Mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek, grafiksel olarak bilgisayar sistemine aktarılır. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur.

BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France): Besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor içeren ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren, bilgisayar destekli bir sistemdir. Kan haricinde tüm klinik örnekler için uygundur (43).

2.6.5 Morfolojik ve Biyokimyasal Tanımlama Testleri

Biyokimyasal Tanımlama Testleri; üreme hızı ve ısısı, pigment üretimi, koloni görünümü, kord faktör oluşumu, niasin testi, nitrat redüksiyonu testi, katalaz testi, pirazinamidaz testi, Tween 80 hidrolizi testi, arilsülfataz testi, üreaz testi, PNB (para-nitro benzoik asit) içeren besiyerinde üreme gibi klasik morfolojik ve biyokimyasal özelliklere göre tanımlama yapılabilmektedirler (Tablo 3 ve 4) (32).

Tablo 3. *Mycobacterium tuberculosis complex* üyelerinin biyokimyasal özellikleri.

Tür	TCH	Prazinamidaz	Nitrat Redüktaz	Oksijen
<i>M. tuberculosis</i>	dirençli	+	+	Aerobik
<i>M. bovis</i>	duyarlı	-	-	
<i>M. bovis BCG</i>	duyarlı	-	-	Aerobik
<i>M. africanum</i>	duyarlı	+	-	Mikroaerofilik
<i>M. microti</i>				

* Thiophen-2-carboxylic acid hydrazide

Tablo 4. İnsanlardan izole edilen atipik mikobakterilerin biyokimyasal özellikleri.

Tür	Niasin Yapımı	Nitrat Redüksiyonu	Tween Hidrolizi	Üreaz	Aril Sülfataz	Katalaz 68 ⁰
Fotokromojenler						
<i>M.kansasii</i>	-	+	+	+	+	+
<i>M.marinum</i>	-	-	+	+	+	+
<i>M.simiae</i>	+	-	-	+	+	+
Skotokromojenler						
<i>M.scrofulaceum</i>	-	-	-	+	-	+
<i>M.xenopi</i>	-	-	-	-	+	+
<i>M.szulgai</i>	-	+	±	+	±	+
<i>M.gordonae</i>	-	-	-	-	±	+
<i>M.flavescens</i>	-	+	+	+	±	+
Non-kromojenler						
<i>M.avium complex</i>	-	-	-	-	±	+
<i>M.malmoense</i>	-	-	+	±	±	?
<i>M.haemophilum</i>	-	±	-	-	±	?
<i>M.ulcerans</i>	±	-	-	-	±	+
Hızlı üreyenler						
<i>M.fortuitum</i>	+	+	±	+	+	+
<i>M.chelonae</i>	-	-	±	+	+	+

2.6.6 Moleküler Testler

Günümüzde klinik örneklerden izole edilen mikobakterleri tür düzeyinde saptayabilmek için biyokimyasal testler yerine moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Özellikle 1985 yılında, Mullis ve ark. tarafından tanımlanan polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR) yöntemi moleküler testlerin kullanılmasının önünü açmıştır (32).

Nükleik Asit Amplifikasyon

Moleküler yöntemler içinde, örnekte az miktarda basil bile olsa bunu çoğaltarak saptayabilen Nükleik Asit Amplifikasyon testleri tanı için önem kazanmıştır (44). 'Centers for Disease Control and Prevention (CDC)' direkt bakıdan bağımsız olarak akciğer tüberkülozu şüphesi olan her hastadan en az bir solunum örneğine Nükleik Asit Amplifikasyon testlerini önermektedir (44).

Nükleik Asit Amplifikasyon testleri ile DNA veya RNA doğrudan saptanabilmektedir. DNA veya RNA'nın saptanmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. 'PCR' esaslı bu amplifikasyon testlerinde genellikle Mikobakteri DNA'sının 16S rRNA gen bölgesine ait türe özel primerler kullanılmaktadır. Bu yöntemler sırası ile;

- 'Transcription-mediated Amplification' yöntemi; temelinde transkripsiyona bağlı çoğaltma olup, çoğaltılan hedef nükleik asit 16S-23S rRNA gen bölgeleridir. MTC türlerinin ayırt edilmesinde gryB gen fragmanı ve *M.bovis* BCG için RD1 gen delesyonu bakılmaktadır (39, 40). Amplifikasyonda izotermal ve tek tüpte yapılmaktadır. Böylece kontaminasyon engellenmiş olur. Bu yöntem temel alınarak ticari DNA stripleri de üretilmiştir [Line Probe Assay (LIPA)] (48).

- 'Strand Displacement Amplification' yöntemi; hedef 16S rRNA geninin değişken bölgelerine spesifik gen bölgelerini PCR ile çoğaltmak ve DNA'ların izotermal yol ile amplifikasyonunu sağlamaktır (21).

- Bir diğerk NAA yöntemi olan 'Loop-mediated isothermal amplification' yönteminin hedef bölgesi ise 16S rRNA ve gyrB'dir (44).

Son yapılan 125 merkezli araştırmada bu yöntemlerin özgülük ve duyarlılıkları sırasıyla %97 ve %85 olarak bulunmuştur. NAA testleri, 6-8 saat içinde yapılabilir. Bu yöntemlerin en önemli avantajı, *M. tuberculosis* hızlı bir şekilde tespit edilebilmeleridir (44).

Lateral flow assays

TB antijenini kalitatif olarak saptayan hızlı immünokromotografik bir yöntemdir. Bu yöntemde kültürden izole MTC'in kendisine özgül proteini MPT64 mevcudiyetinin varlığı saptanmaktadır. Duyarlılık %98.6, özgülük %97.9'dir ve kabin ihtiyacı vardır (44).

DNA sekanslaması

Mikobakterilerin tanımlanmasında seçilen en önemli gen bölgeleri 16S rRNA, rpoB, gyrB, hsp65, secA1, 32 kDa'lık bir protein ya da 16S-23S rRNA gen boşluk kodlayan gen bölgeleridir. 16S rRNA bölgesi hem korunaklı olması, hem her türde fark içermesi açısından bakterilerde en çok tercih edilen bölgedir. Dizi analizleri standartlaştırılması ile ilgili çeşitli web siteleri olduğu gibi ticari kitler de bulunmaktadır. Pahalı, zaman alıcı ve yorucu bir yöntemdir, 1-3 gün alır. İyi bir teknisyen ve iyi otomatik analiz sistemlerine gerek vardır (49, 50, 51).

Kütle Spektrometresi (Maldi Tof MS)

Genomların kodladığı protein ürünlerinin dizi incelenmeleri gelişen spektrometrik sistemlerin de sayesinde mümkün olmuştur. Böylece mikroorganizmaların kütle spektrometresine dayanan tanımlama yöntemi Maldi Tof MS laboratuvarlarda yerini almıştır. Literatürde ise moleküler yöntemlerin bir parçası olarak yerini almıştır (49).

Maldi Tof MS'de tanımlanmak istenen koloni veya ekstrakt 'target slayt' denen metal preparata yayılır, üzerine matriks solüsyonu eklenir ve cihaza yerleştirilerek lazer atışlarına maruz bırakılır. En uygun matriks maddesi aromatik moleküllerdir (4-hydroxy- α -cyanocinnamic acid, 2.5-

dihydroxybenzoic acid, 3.5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid). Lazer enerjisini absorbe eden matriksin molekülleri aktive olarak, mikroorganizma-matriks kompleksinde mikro patlamalar oluşmasına neden olur. Ardından moleküller iyonlaşır, matriksle birlikte mikroorganizmaya ait moleküller preparattan ayrılarak serbest hale geçer. Elektriğe maruz kalan iyonize moleküller detektöre doğru hızlanmaya başlarlar. Kütle/yük (m/z) oranıyla gösterilen kütle ve molekülün yüküne göre iyonların hızı oluşur ve iyonlar kütlelerine göre detektöre çarparlar ve küçük kütleye sahip iyonlar detektöre önce ulaşır. Sonuçta mikroorganizmaya ait proteinlerin, detektöre çarpma zamanına göre kütle spektrumu oluşturulur ve kaydedilir. Bir Maldi Tof MS spektrumunda x eksenini proteinlerin m/z oranını gösterirken y eksenini proteinlerin yoğunluğunu gösterir. Kaydedilen spektrum, mevcut veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılır ve sonucun güvenilirliği bazı sistemlerde skorumla ile bazı sistemlerde yüzde ile belirlenir (50).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Etüv 37°C (Memmert)

Buzdolabı (Arçelik)

-20°C Dondurucu (Arçelik)

Otoklav (Hirayama)

Pasteur fırını (Memert)

Vorteks karıştırıcı (Yellow line)

Vorteks karıştırıcı (VORTEX-2 Genie)

Mini Santrifüj (Beckman Counter)

Hassas terazi (Scaltec)

Biyolojik kabin (Metisafe)

Termal Döngü Cihazı (Techne, BIO RAD)

Jel yürütme tankı (Biometra/Agagel Maxi)

UV görüntüleyici (Vilber Lourmant)

MGID (BD)

VITEK MS (bioMérieux)

Çalkalayıp ısıtıcı (Twin cubator)

Cryo Tüp 2 ml (Biosigma)

0.5 mm cam boncuk

Vial vidalı 2 mL (Axygen)

PCR tüp 0.5 mL (Axygen)

PCR TUBES, Dnase ve Rnase free 0.2 mL (Axygen)

Pipet ucu 1-20-1000 µL (Axygen)

3.1.2 Kullanılan Besiyerleri

Löwenstein-Jensen Besiyeri (Becton-Dickinson)

Middlebrook 7H9, MGIT (Becton-Dickinson)

3.1.3 Kimyasal Maddeler

Etanol (Merck)

Formik asit (Merck)

Asetonitril (Merck)

Agarose (Peqlab)

Tris Hydrochloride (Roche)

Borik Asit (Carlo Erba)

EDTA (Thermo Scientific)

Etidyum bromür (Merck)

3.1.4 Kullanılan Ticari Kitler

GenoType Mycobacterium CM (Hain lifescience)

GenoType Mycobacterium AS (Hain lifescience)

VITEK MS tanımlama kiti (bioMérieux)

MGIT TBc Tanımlama Testi (MPT64 Ag) (Becton Dickinson)

3.2 Yöntem

3.2.1 Örnek Seçimi

Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na 2012-2013 yıllarında gelen 106 stoklanmış örnekten; aynı hastaya ait ilk örnek çalışmaya dahil edilmiş, tekrar eden örnekleri çalışma dışı bırakılmıştır. 56 adet MTC ve 13 adet NTM olmak üzere toplamda 69 klinik örnekle çalışılmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen 69 örneğin 47 (%68)'si solunum, 22 (%32)'si solunum dışı örneklerden oluşmaktadır. Solunum dışı örnekler apse (n:10), biopsi (n:7), idrar (n:3) ve beyin omurilik sıvısından (n:2) oluşmaktadır.

3.2.2 Örneklerin Ekimi ve Üreme Takibi

Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na 2012-2013 yıllarında gelen ve -20°C'de MGIT besiyerinde stoklanan mikobakteri olarak raporlanmış izolatlar, vorteks yardımı ile homojenize edildikten sonra 0.2 mL L-J besiyerine, 0.5 mL MGIT besiyerine pasajlanmıştır. Ekilen L-J'ler etüvde, MGIT'lar üreme durumunda sinyal veren özel etüvünde (BD MGIT 960, Sparks, MD) 35-37°C'de 8 hafta inkübasyona kaldırılmıştır.

MGIT besiyerinde üreme sinyali veren örnekler Gram ve EZN boyama yapılarak aside dirençli basil ve/veya kontaminasyon açısından değerlendirilmiştir. Kontamine olduğu düşünülen örnekler NALC-NAOH yöntemi ile dekontaminasyon işlemine tabi tutularak hem L-J hem de MGIT besiyerine ekilip üremeleri 8 haftaya tamamlanacak şekilde kaldığı yerden takip edilmiştir. Katı besiyerinde ise üreme takibi ilk 5 hafta gün aşırı, sonraki 3 hafta haftada 2 kez olacak şekilde düzenlenmiş ve üreme saptanan besiyerleri Gram ve EZN boyamaları yapılarak MGIT için uygulanan prosedür aynen uygulanmıştır.

Dekontaminasyon işleminde, kontamine MGIT tüpündeki örnek veya kontamine L-J kolonileri distile su ile karıştırılmış olarak işleme alınmıştır. Falcon tüplerine konan örneğin üstüne kendi miktarı kadar NALC-NaOH, 50 ml trisodyum sitrat, 50 mL NaOH solüsyonundan eklenmiş ve falkon vorteks ile karıştırılarak 15 dk. oda ısısında bekletilmiştir. Falcon tüplerindeki örneğin üstü 50 mL'ye kadar PBS (Phosphate Buffer Solution, pH:6.8) ile tamamlanarak 3000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra falkondaki süpernatant kısım dökülerek kalan sedimente 1-2 mL PBS eklenmiş ve pH:7 olana kadar PBS eklemeye devam edilmiştir (33). Elde edilen dekontamine örnekten 0.2 mL alınarak L-J'ye, 0.5 mL alınarak MGIT'a ekim yapılmış etüvlerine kaldırılmışlardır. Üreme takipleri kaldıkları günden itibaren 8 haftaya tamamlanmıştır.

Hem L-J hem de MGIT'da üretilen MTC örnekleri ve herhangi bir besiyerinde üretilen atipik mikobakteriler işleme alınmıştır.

3.2.3 Tanımlama Yöntemleri

3.2.3.1 TBc Tanımlama Testi ile Mikobakteri Türlerinin Tanımlanması

Üreme sinyali veren MGIT tüpü etüvden çıkarıldı. ARB boyanarak mikobakteri üremesi açısından değerlendirildi. ARB pozitif örnekler, test için işleme alındı.

-ARB pozitif MGIT tüpü vorteksleyerek tamamen karıştırıldı, santrifüj edildi.

-TBc ID kartı, testten hemen önce folyo torbasından çıkarıldı

-Steril bir pipet ucu kullanarak uygun şekilde kartın örnek kuyusuna örneğin 100 µL'si yerleştirildi. 15 dk. beklendi. Sonuç kaydedildi.

Klasik tanımlama yöntemi MGIT besiyerinde çalışılan bu test; MGIT üremeli tüpünden MTC'ye özgü MPT64 proteini varlığı immünokromotografik olarak saptamaya yöneliktir.

TBc için Pozitif Test (MPT64 antijenli) – Okuma penceresinde Test “T” konumunda ve Kontrol “C” konumunda pembe veya kırmızı bir çizgi görülürse, örnekte MPT64 antijeninin saptandığını gösterdi, MTC olarak kaydedildi.

TBc için Negatif Test (MPT64 antijeni saptanmadığında) – Okuma penceresinin Test “T” konumunda pembe veya kırmızı çizgi görülmezse, örnekte MPT64 antijeninin saptanmadığını gösterdi. NTM olarak kaydedildi.

3.2.3.2 Mikobakterilerin Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemi ile Tanımlanması

İlk olarak DNA İzolasyonu için üreme saptanan sıvı kültürlerden 100 µL alınıp vortekslenerek homojenize edildikten sonra 15 dk. 10.000 g'de santrifüj edilip süpernatant atıldı.

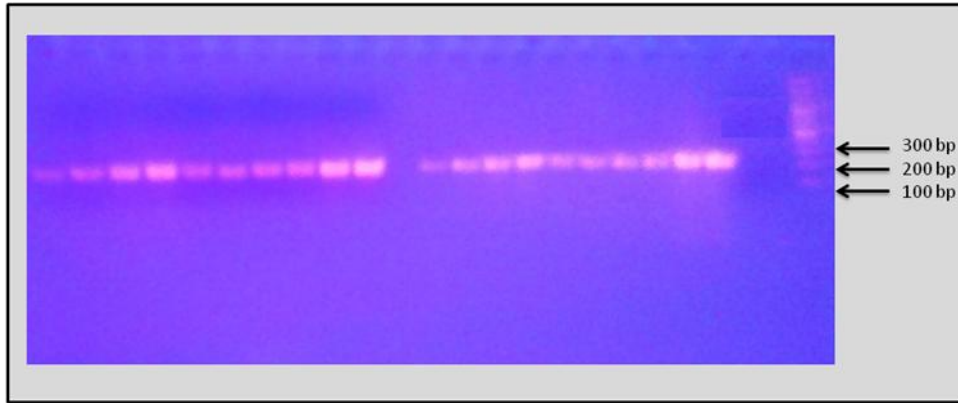
- Pelet 100 µL Lizis Tamponu ile süspanse edilip 100°C'de 5 dk. kaynatıldı. Nötralize edici tampondan 100 µL eklendikten sonra 5 dk. maksimum hızda santrifüj edildi. Üstteki Lyase/DNA temiz bir ependorfa alındı.

Katı kültürlerde üreme saptanan örneklerden 1-2 koloni alınarak 100 µL Lizis tamponu içinde süspansiyon edilip, kalan yerden prosedüre devam edildi (52).

Amplifikasyonda her bir örnek için: 35 µL PNM (Primer Nucleotide Mix), 5 µL 10x PCR buffer (15mM MgCl₂ içerir), 2 µL MgCl₂ (25 mM MgCl₂), 3 µL H₂O, 0.2 µL Taq polimeraz (1 ünite) sıra ile konularak süspansiyon edildi. 5 µL örneğe ait DNA solüsyonu eklenerek toplamda 50 µL amplifikasyon solüsyonu elde edildi.

- Termal döngü cihazı; 95°C'de 5 dk. (1 döngü), 95°C'de 30 sn. (10 döngü), 58°C'de 2 dk. (10 döngü), 95°C'de 25 sn. (20 döngü), 53°C'de 40 sn. (20 döngü), 70°C'de 40 sn. (20 döngü), 70°C'de 8 dk. (1 döngü) olacak şekilde ayarlandı ve örnekler cihaza konuldu.

- Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin her biri 5 µL hazırlanmış olduğumuz %1.2 etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirildi. Agaroz jel 90-100 V'da 15-20 dk. elektroforeze tabi tutuldu. Transilluminatörde UV ışığı altında 200-230 bp bandında elde edilen ürünler izlendi (Şekil 3).

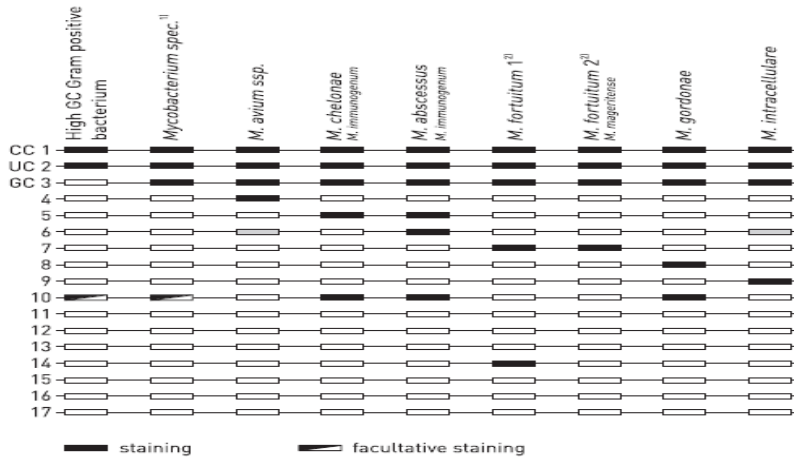


Şekil 3. Mikobakteri izolatlarına ait PCR ürünlerinin transilluminatör altındaki görüntüsü

Hibridizasyon Basamağında ise: HYB (Hibridizasyon Buffer), RIN (Rinse Solution) STR (Stringent Wash Solution) ve distile su oda ısısına getirildi. CON-C (Conjugate Concentrate) ve SUB-C(Substrate Concentrate), 1:100 dilasyonları hazırlandı.

- Plaklarının her bir kuyucuğuna 20 µL denatürasyon solusyonu (DEN) ve 20 µL amplikon ürünü konarak karıştırıldı. Oda ısısında 5 dk. muamele edildi. Son kuyucuk negatif kontrol olarak kullanıldı.
- Her kuyucuğa HBY eklendi, karıştırıldı ve DNA Stripleri yerleştirildi. TwinCubator cihazına 12 kuyucuklu plak yerleştirildi. Cihazda 30 dk. 45°C'de çalkalanıp inkübasyon başlatıldı. Sonra tüm HYB aspire edildi.
- Ardından her kuyucuğa yıkama solusyonu eklenerek 15 dk. 45°C'de çalkalanıp, inkübe edildi. Yıkama solusyonu tamamen boşaltıldı.
- Son aşamada 1:100'lik konjugat solüsyonundan (10 µL x 12 CON-C + 990 x 12 CON-D) 1 mL her bir kuyucuğa konarak TwinCubator'de 30 dk. oda ısısında inkübe edilip solüsyon tamamen boşaltıldı ve yıkandı.
- Sonra 1:100 lik Substrat solüsyonundan (10 µL x 12 SUB-C + 990 x 12 SUB-D) 1 mL her bir kuyucuğa konarak TwinCubator'de 2-10 dk. oda ısısında inkübe edildikten sonra solüsyon tamamen boşaltıldı. Distile su ile yıkandı. Böylece reaksiyon durduruldu.

Plakların içindeki DNA Stripleri çıkarılarak sıvı emen kâğıdın üzerine konup kuruması sağlandı. Her bir strip genel tanımlama kartı CM ve/veya AS kartının paraleline getirildi. Reaksiyon zonları tanımlama kartı ile kıyaslanarak tanı kondu (48) (Şekil 4).



Şekil 4. GenoType Mycobacterium CM Tanımlama Kartı.

3.2.2.2. Maldi Tof MS ile Mikobakteri Türlerinin Tanımlanması

Üremeli MGIT sıvı besiyerinden (BD) 1.8 mL alınarak, 2 mL vidalı kapaklı ependorfa kondu, 10 dk. 8000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı,

- Pelet 500 µL %70'lik etanol ile süspansiyon edildi, sonra 0.5 mm cam boncuk bulunan 2 mL kapaklı ependorfa alındı, 15 dk. vorteksle, oda ısısında 10 dk. inkübasyona bırakıldı, tekrar vorteks işlemi uygulandıktan sonra cam boncuksuz olarak süspansiyon 2 mL kapaklı ependorfa aktarıldı,

- Örnekler 14000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı, sonra 10 µL %70'lik formik asitle süspansiyon edildi, bu karışıma 10 µL %100'lük asetonyitril eklendi ve vorteksle, 14000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi,

- Oluşan süpernatantın 1 µL'si MS slaydına (target slide) kondu, kuruyan süpernatant üzerine 1 µL CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) matriks solüsyonu eklendi. Preparat kuruduktan sonra Maldi Tof MS (bioMérieux) cihazı ile tanımlama yapıldı (Şekil 5).

L-J'da üreyen koloniden 1 µL öze dolusu alınıp, 500 µL %70'lik etanol ile süspansiyon edildi, sonra 0.5 mm cam boncuk bulunan 2 mL kapaklı ependorfa alınarak vorteksle, sonra sıvı besiyeri için uygulanan prosedür aynen uygulandı (53) (Şekil 5).



Şekil 5. MS Prosedür Basamakları (Çalışmamızdan)

3.2.4.İstatistiksel Yöntemler

Verilerin istatistiksel deęerlendirmesinde:

Tanımlama yöntemlerinden Maldi Tof MS ve Nükleik Asit Hibridizasyon (NAH) arasında tanımlama açısından anlamlı farkın olup olmadığı, Kİ-kare yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır..

Maldi Tof MS (bioMérieux) yönteminin duyarlılığı; moleküler yöntem NAH ve klasik yöntem TBc Tanımlama Testi ile uyumu açısından değerlendirilmiştir. Negatif örnekle çalışılmadığı için özgüllük uyumuna bakılmamıştır.

4.BULGULAR

Altın standart olarak kullandığımız klasik tanımlama yöntemi 'TBc Tanımlama Testi' ile, çalışmamıza dahil ettiğimiz 69 örneğin 13 (%19)'ü NTM ve 56 (%81)'sı MTC olarak tanımlanmış, NTM için tür düzeyinde tanımlanama yapılamamıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Tanımlama Yöntemlerinin kapasitelerinin karşılaştırılması

	MTC n (%)	NTM n (%)	Toplam Tanımlanan n (%)
TBc Tanımlama Testi	56 (81)	13 (19)	69 (100)
NAH	56 (81)	13 (19)	69 (100)
Maldi Tof MS	56 (81)	5 (7)	61 (88)

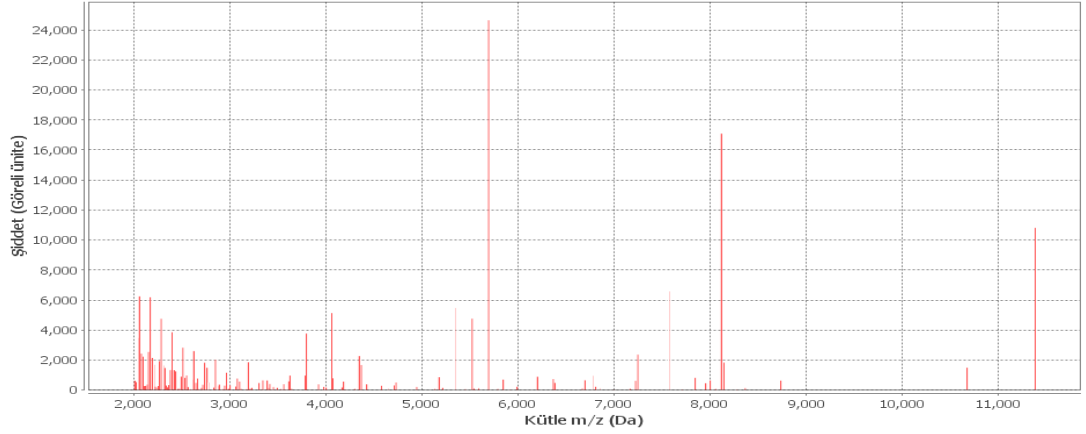
'Nükleik Asit Hibridizasyon (NAH)' yöntemi ile örneklerin 56 (%81)'sı MTC, 13 (%19)'ü NTM olarak tanımlanmış, tanımlanamayan örnek olmamıştır (Tablo 5). Bu yöntemle NTM'lerin hepsi tür düzeyinde de tanımlanabilmiştir. NTM'ler arasında en sık *M.intracellulare* (n:5) türü saptanırken; bunu sırası ile *M.lentiflavum* (n:3), *M.xenopi* (n:2) ve *M.malmoense*, *M.abscessus*, *M.avium* (n:1) türleri izlemiştir (Tablo 6).

Tablo 6. NTM türlerinin tanımlanmasında NAH ve Maldi Tof MS yöntemlerinin karşılaştırılması

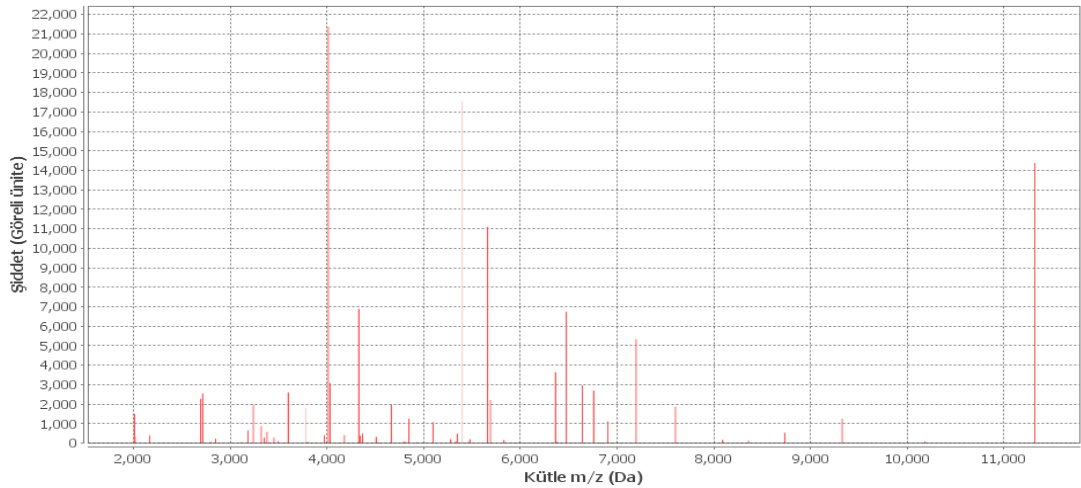
	NAH n(%)	MALDITOF MS n(%)
<i>M.intracellulare</i>	5 (38.5)	5 (38.5)
<i>M.lentiflavum</i>	3 (23)	-
<i>M.xenopi</i>	2 (15.5)	-
<i>M.avium</i>	1(7.6)	-
<i>M.abscessus</i>	1 (7.6)	-
<i>M.malmoense</i>	1 (7.6)	-
TOPLAM	13 (100)	13 (100)

'Maldi Tof MS (bioMérieux)' yöntemi ile %88 örnek tanımlanırken, 8 örnek tanımlanamamıştır. Tanımlanamayan örneklerin tamamı 'NAH ve 'Tbc Tanımlama Testi' ile NTM olarak tanımlanabilmiştir. MTC örneklerinden tanımlanamayan örnek olmamıştır (Tablo 5).

'Tbc Tanımlama Testi' ile örnekler MTC ve NTM olarak iki grupta tanımlanabilmişken; 'Nükleik Asit Hibridizasyon' yöntemi ile NTM'lerin hepsi, 'Maldi Tof MS' ile NTM'lerin 5 adedi (%38.5) tür düzeyinde tanımlanabilmiştir. 'Maldi Tof MS' ile tanımlanan 5 adet NTM'nin hepsi de *M.intracellulare* olarak tanımlanmıştır (Tablo 6) (Şekil 6 ve 7).



Şekil 6. Maldi ToF MS ile MTC olarak tanımlanmış bir izolatin spektrası.



Şekil 7. Maldi ToF MS ile *M.intracellulare* olarak tanımlanmış bir izolatin spektrası.

Katı besiyerinde üretilen 65 örnek 'Maldi ToF MS' ile çalışılmış ve MTC'lerin tamamı tanımlanırken; NTM'lerden 13 örneğin 3'ü tanımlanmış olup, tamamı *M.intracellulare* olarak saptanmıştır. Tanımlanamayan 7 örneğin tamamı ise 'NAH' ve 'TBc Tanımlama Testi' ile NTM olarak saptanmıştır.

Sıvı besiyerinde üretilen 61 örnek 'Maldi ToF MS' ile çalışılmıştır. Bu yöntemle sıvı besiyerinde 49 örnek MTC olarak, 3 örnek NTM

(*M.intracellulare*) olarak saptanmıştır. 'NAH' ve 'TBc Tanımlama Testi' ile 2'si NTM, 7'si MTC olarak tanımlanan 9 örnek; 'Maldi Tof MS' ile sıvı besiyerinde tanımlanamamıştır.

'TBc Tanımlama Testi' ile tüm türler tanımlanmış ancak NTM'ler tür düzeyinde tanımlanamamıştır. Örnek başı maliyeti 3 € olup, tanımlama 15 dk. sürmüştür. 'Maldi Tof MS yöntemi' ile tanımlama %88 düzeyinde olmuştur. NTM'lerin 5 (%38.5)'i tür düzeyinde tanımlanabilmiştir. Maliyeti örnek başına 1 € olup, tanımlama 45 dakika almıştır. 'Nükleik Asit Hibridizasyon' yöntemi ile tanımlanamayan örnek olmamış ve NTM'lerin hepsi tür düzeyinde tanımlanmıştır. Maliyet örnek başına 30 €, harcanan zaman 6-7 saat olmuştur (Tablo 7).

Tablo 7. Yöntemlerin Tanımlama, Maliyet, Zaman açısından Karşılaştırılması

	MTC ve NTM şeklinde Tanımlama	NTM Tür Düzeyinde Tanımlama	Maliyet / örnek başı	Zaman/ örnek başı
	%	%		
TBc Tanımlama Testi	100	0	3 €	15 dk.
Maldi Tof MS	88	38.5	1 €	45 dk.
NAH	100	100	30 €	6-7 saat

Maldi Tof MS'in duyarlılığının, Nükleik Asit Hibridizasyon ve Klasik yöntem ile uyumuna bakıldığında; MTC tanımlaması açısından %100 uyum bulunmuştur. NTM'lerin tür düzeyinde tanımlanması açısından, Maldi Tof MS'in duyarlılık uyumu, Nükleik Asit Hibridizasyon ile bakıldığında; %38.5 bulunmuştur.

Maldi Tof MS ve Nükleik Asit Hibridizasyon arasında tanımlama açısından fark olup olmadığı Ki-kare istatistiksel metod kullanılarak karşılaştırıldığında, iki yöntem arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 1993 yılında Tüberküloz için 'Küresel bir Halk Sağlığı Sorunu' tanımlamasını kullandıktan sonra, sürekli veri toplanmış ve sorunun kaynağına ulaşılmaya çalışılmıştır. DSÖ'nün 'Küresel Tüberküloz 2013 Raporu' ile dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin tüberküloz mikrobuyla enfekte olduğu bildirilmiş ve 2012 yılı verilerine göre 8.6 milyon yeni vakanın ancak 5.7 milyonun saptanabildiği raporlanmıştır (2). Özellikle 1980'li yıllardan sonra, HIV vakalarının artması ile NTM enfeksiyonlarının da görülme sıklığı artmıştır. Bu türlerin tedavi protokollerindeki farklılıklar, mikobakterileri tür düzeyinde tanımlamayı gerekli kılmıştır (19). Laboratuvarımızda kullanılmakta olan klasik yöntem olarak, BD MGIT sıvı besiyerinden MTC'e özgü MPT64 proteinini immünokromotografik olarak saptayan 'TBc Tanımlama Testi', mikobakterileri sadece MTC ve NTM olarak tanımlayabilmekte ve tür düzeyinde tanımlama yapamamaktadır. Yapılışının kolaylığı ve tanımlamadaki güvenilirliği yüzünden oldukça tercih edilen bir yöntemdir (44). Fakat NTM şüphesi olan hastalarda bu tanımlama testi, tedavi planlaması için yetersiz kalmaktadır.

Günümüzde mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal yöntemler zor ve zaman alıcı oldukları için, tanı ve tedavide gecikmelere sebep olduğu bilinmektedir (32). Tanımlamada hızlı, kolay, ucuz yöntemlerin arayışı sürmektedir. Fakat bu yöntemlerin tam işlevsel hale gelmeleri için hala çalışmalara gerek vardır. Bu çalışmalara destek amaçlı, bizde çalışmamıza hastane laboratuvarımızda uygulayabileceğimiz, özellikle NTM'leri tür düzeyinde tanımlamamıza yardımcı olacak yeni yöntemlerden ikisini [Nükleik Asit Hibridizasyon (GenoType Mycobacterium CM/AS) ve Maldi Tof MS (VITEK MS/bioMérieux)] kullandık (48, 53).

Son yıllarda kullanıma giren moleküler yöntemler arasında; DNA sekanslaması, Lateral flow assays, Nükleik Asit Amplifikasyon (NAA) testleri sayılabilir. Ülkemizde, son yıllarda NTM türlerini tanımlamaya dayalı epidemiyolojik ve özel araştırmalarda Nükleik Asit Hibridizasyon ticari kiti

Line Probe Assay (LIPA) yönteminden (GenoType® Mycobacterium CM/AS kitleri) faydalanılmıştır. Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı bu yöntemi kullanarak, 2009 Ocak-2010 Aralık tarihleri arasında yaptığı epidemiyolojiye yönelik çalışmalarında en sık %33.3 ile *M.fortuitum*'a rastlamışlardır (5). Diğer bir çalışmada Biçmen ve arkadaşlarının, Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi EAH Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen 2009-2014 yıllarına ait 70 adet NTM örneğinden retrospektif olarak LIPA yöntemi ile yaptıkları çalışmadır. En sık %21.4 ile *M.intracellulare* türünü tanımlamışlardır (54). Biz de klinik örneklerde en sık *M.intracellulare* (13 örnekte 5 adet) ile karşılaştık (Tablo 6). Amerika, İngiltere, Hong Kong gibi ülkelerde yapılan çalışmalarda da *M.intracellulare* klinik örneklerden en çok tanımlanan NTM türü olarak ifade edilmiştir (21, 24, 27).

Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemi ile çalışan ticari DNA problemlerinin aynı anda mikobakteriyi tür düzeyinde tanımlayan hızlı, yapımı kolay testler olarak ön plana çıkması sebebiyle çalışmamızda yer almıştır. Son yapılan 125 merkezli araştırmada Nükleik Asit Amplifikasyon yönteminin özgüllük ve duyarlılıkları sırasıyla %97 ve %85 olarak bulunmuştur ve bu testlerin ortalama 6-8 saat içinde yapılabildiği bildirilmiştir (44)

Bu yöntem mikobakteri türlerini (*M. tuberculosis complex*, *M. avium*, *M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.gordonae*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M.marinum*, *M.peregrinum*, *M.scrofulaceum*, *M.interjectum*, *M.xenopi* ve *M.abcessus*, *M.simiae*, *M.mucogenicum*, *M.goodii*, *M.celatum*, *M.smegmatis*, *M.genavense*, *M.lentiflavum*, *M.heckeshornense*, *M.szulgai*, *M.phlei*, *M.haemophilum*, *M.kansasii*, *M.ulcerans*, *M.gastri*, *M.asiaticum* ve *M.shimoidei* tanımlar) 23S rRNA genlerini hedefleyerek tanımlayabilmektedir (44, 49). MTC alt türlerinin ayırt edilmesinde gryB gen fragmanı ve *M.bovis* BCG için RD1 gen delesyonunu kullanmaktadırlar (48, 55).

Moleküler yöntemlerin yanında, rutin uygulamalarda aynı potansiyele sahip, daha kolay, hızlı ve ucuz bir yöntem olan Malditof MS yöntemi, mikobakteri tanımlamasında son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Yöntem mikobakteri açısından oldukça yenidir (51). Mikroorganizmaları kütle spektrometresine göre tanımlayan proteomik bir yöntemdir. Birçok bakteriyi

tanımlamada oldukça yeterli spektralar oluşturulmuş ve rutine konmuş olmasına karşın, mikobakterilere ait durum tam netlik kazanmamıştır. Son yıllarda ki tüm çalışmalar kaliteli spektralar elde edip, yeni veri tabanları oluşturmaya yöneliktir (56, 57). Biz çalışmamızda, Maldi Tof MS yönteminin mikobakteri tanımlamasındaki yeterliliğini ve rutin mikobakteriyoloji laboratuvarına uygunluğunu, VITEK MS V2.0 (bioMérieux) veri tabanını kullanarak irdelemeye çalıştık (Tablo 8).

Tablo 8. VITEK MS V2.0 (bioMérieux) ile tanımlanabilen Mikobakteri türleri.

<i>Mycobacterium africanum</i>
<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Mycobacterium malmoense</i>
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
<i>Mycobacterium smegmatis</i>

Maldi Tof MS ile mikobakterilerin tanımlanması çalışmalarına Hettick ve arkadaşları, 2004 yılında 6 farklı mikobakteri türü ile başlamışlardır (58). Hemen arkasından Pignone ve arkadaşları da Hettick ve arkadaşlarını takip etmişlerdir (59). Ağırlıklı olarak sistemleri standardize etme ile ilgili olan bu ilk çalışmalar üzerine Lotz, El Khe'chine, Paul ve Balada-Llasat arkadaşları ile Bruker Daltonics sistemini kullanarak çalışmalar yapmışlar ve 20 kV'da, 2000-20.000 kDa arasında 60 frekansta kaliteli spektralar elde etmişlerdir. Böylece Bruker Daltonics sistemi için çalışma programını standart olarak yerleştirmişlerdir. (60, 61, 62, 63, 65).

Jonathan H.K.Chen ve Cheryl A. Mather'de arkadaşlarıyla benzer bir çalışmayı VITEK MS (bioMérieux) sistemi ile yapmışlar, 20kV'da, 20-20.000 m/z'de, 50 hertz frekans ile kaliteli spektralar yakalamışlar ve VITEK MS (bioMérieux) için standart bir program kurulmasında etkili olmuşlardır (65).

VITEK MS (bioMérieux) sistemi için standartlaşmış bu program, bizim çalışmamızda da yer alan programdır.

Maldi Tof MS ve mikobakteri ile ilgili diğer çalışmalar inaktivasyon ve protein elde etme (ekstraksiyon) üzerinde yoğunlaşmıştır. İlk Hettick ve arkadaşları tarafından 2004 yılında trifloroasetikasit ile inaktivasyon çalışmaları başlamış olup, Pignone ve arkadaşlarının su ile yıkama ve santrifüj denemeleri ile devam etmiştir (59). Bruker Daltonics (Bremen, Germany) ile yapılan çalışmalardan; Lotz ve arkadaşları %70'lik etanol ve distile su ile hem inaktivasyon yapmayı hem de protein elde etmeyi denemişler (60), El Khe'chine ve ark. ise %70'lik etanol ile 95°C'de 30 dk. ısı içeren iki farklı inaktivasyon yöntemini, sekiz farklı ekstraksiyon yöntemi ile çalışmışlardır (61). Sonuçta, en uygun yöntemin; inaktivasyon için ısı, yıkama için distile su, protein eldesi için %70'lik etanol ile %100'lük acetonitril ve 0.5 mm cam boncuktan oluşan hücre parçalama yöntemi olduğu konusunda fikir birliği sağlanmıştır.

Benzer bir araştırmayı Alexandra Machen VITEK MS (bioMérieux) için yapmıştır. Isıtma ve hücre parçalama yöntemlerini VITEK MS (bioMérieux) kullanarak çalışmışlardır. Isıtmalı yöntem ile %82.2 mikobakteri, hücre parçalama yöntemi ile %88.8 mikobakteri tanımlayabilmişlerdir. Dolayısı ile VITEK MS (bioMérieux) kullanılacaksa inaktivasyon ve protein eldesi için hücre parçalama yönteminin, ısı yönteminden daha uygun olacağını belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızda bu veriler ışığında hücre parçalama yöntemi kullandık (66).

Çalışmamızda katı besiyerinden %89, sıvı besiyerinden %85 düzeyinde mikobakteri tanımlanmıştır. Katı besiyeri ile sıvı besiyeri tanımlama yüzdeleri, katı besiyeri lehine olmuştur. Lotz ve arkadaşları da 311 örnek, 31 farklı tür içeren lokal verilerini de kullanarak Maldi Tof (Bruker Daltonics) ile çalışmışlar ve katı besiyerinde %97, sıvı besiyerinde %77 tanımlama oranları bulmuşlardır. Sıvı besiyerindeki düşük tanımlama yüzdesinin nedenini Lotz ve arkadaşları şöyle açıklamışlardır; üreyen kolonilerin, uygulanan ekstraksiyon yönteminin yoğunluğu ile kaybın ve ısı ile inaktivasyon yönteminin sıvı besiyeri için uygun olmayabileceği. Bizim

çalışmamızda, sıvı besiyerinde ısı uygulanmadan hücre parçalama yöntemi ile daha iyi sonuç elde edilmiş olması, Lotz ve arkadaşlarını destekler niteliktedir (60).

Paul ve arkadaşları, 42 mikobakteri türüne ait lokal verilerini de kullanarak 104 klinik örnekte BioTyper software (version 2.0.4) ile çalışmışlar ve 4 NTM türü dışında tüm türleri tanımlayabildiklerini ifade etmişlerdir (62). Balada-Llasat 18 mikobakteri türüne ait lokal verilerini Biotyper Software (version 3.0) ile birleştirmiş ve 178 mikobakteri örneğinin 11 adedini tür düzeyinde tanımlayamamışlardır. Bu durumda %93.8 mikobakteriyi tür düzeyinde tanımlayabilmişlerdir (63). Bizim çalışmamızda %88 tanımlama oranı yakalanmıştır. Tanımlanamayan tüm mikobakteriler NTM, tanımlanabilen tüm NTM'ler *M.intracellulare* olarak saptanmıştır. VITEK MS V.2.0 sisteminin tanımladığını ileri sürdüğü NTM türlerinden sadece *M.intracellulare* tanımlanmıştır. Buda VITEK MS V.2.0 sistemide, NTM için tür çeşitliliğinin az olması yanında var olan spektralarında türler için yetersiz olduğunu göstermektedir (Tablo 8).

Jonathan H. K. Chen ve ark. katı besiyerinden elde ettikleri 20 tür içeren lokal verilerini hem Bruker Biotyper hem de bioMérieux VITEK MS sistemlerine yükleyerek katı ortamdan çalışmışlardır. Biotyper ile %87.3'ünü gen, %62.8'ini tür düzeyinde tanımlarken, VITEK MS ile anlamlı sonuçlar elde edememişlerdir. VITEK MS ile iyi spektralar elde etmelerine karşın tanımlamadaki problemi, bizim düşüncemizle paralel olarak VITEK MS veri bankasının kısıtlılığına bağlamışlardır (Tablo 8) (64).

Çalışmamız sırasında mikobakterileri tanımlamak için kullanılan Maldi Tof MS'i; 'Nükleik Asit Hibridizasyon' ve 'TBc Tanımlama Testi' ile karşılaştırdık. Klasik yöntem 'TBc Tanımlama Testi'nin duyarlılığı %98.6, özgüllüğü %97.9'dur. Klinik örnekten yapılan 'Nükleik Asit Hibridizasyon' yönteminde ise bu oran sırası ile %85 ve %97 olarak sıralanmaktadır (44). Ancak TBc Tanımlama Testi ile NTM'leri tür düzeyinde ayıramazken, Nükleik Asit Hibridizasyon yöntemiyle tüm izolatlar tür düzeyinde tanımlanmıştır. Maldi Tof MS (bioMérieux)'de ise tür düzeyinde tanımlanamayan %11 (n:7)

mikobakteri saptanmıştır. Bunların hepsi 'Nükleik Asit Hibridizasyon' ve 'Tbc Tanımlama Testi' ile NTM olarak tanımlanmış örneklerdir (Tablo 5).

Maldi Tof MS'in duyarlılığındaki uyum, Nükleik Asit Hibridizasyon ve Klasik yöntemle karşılaştırıldığında; MTC için uyum %100, NTM'lerin tür tanımlanmasındaki uyum ise oldukça düşük olarak %38.5 bulunmuştur. Bu düşük uyum Maldi Tof MS yönteminde tanımlama yetersizliğini göstermiştir.

Maldi Tof MS, yaklaşık maliyetinin hasta başı 1€ olması ile, hasta başı maliyeti 30 € olan Nükleik Asit Hibridizasyon'a göre daha avantajlı olmasına rağmen, NTM'lerde tür düzeyinde tanımlama yapmadaki yetersizliği ile tanımlama da dezavantajlı durumdadır (Tablo 7).

Sonuçta; Maldi Tof MS maliyet etkin olmasına rağmen, özellikle NTM'ler için tür tanımlama açısından yetersiz spektralara sahip bulunmuştur. Bu açıdan günümüzde Maldi Tof MS'in, Nükleik Asit Hibridizasyon gibi moleküler yöntemlere kıyasla rutin tüberküloz laboratuvarlarında kullanımı için yetersiz olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın; Maldi Tof MS'te NTM'ler için, MTC tanımlamasındaki yüksek uyum dikkate alındığında, spektra geliştirilmesi ile yüz güldürücü sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Aksaray N, Özgür Ö. Diagnosis of Tuberculosis. Journal of Pediatric Inf., 2011; 5: 54-58.
2. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2013. (www.who.int/tb/publications/global_report)
3. TC. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, (http://thsk.saglik.gov.tr/tuberkuloz-verem-hastaligi)
4. Babacan F, Hasdemir U. *Mycobacterium Tuberculosis Complex*. Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı syf:2283-2302 Nobel Tıp Kitapevleri, 2008.
5. Albayrak N, Şimşek H, Sezen Figen. Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında 2009-2010 Yıllarında Tespit Edilen Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Dağılımlarının İrdelenmesi. Mikrobiyoloji Bülteni 2012; 46,5.
6. Yaman G, Eran Z, Çelikkan Ç. MALDI TOF-MS Rutin Veri Tabanı ile Mikobakteri İdentifikasyonu. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 2012;272.
7. Minan A, Bosch A, Lash Peter. Rapid Identification of *Burkholderia Cepacia Complex* Species Including Strains of Recovered from Cystic Fibrosis Patients by Intact Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry. Analyst, 2009; 134, 1138–1148.
8. Terracciano R, Preiano M, Palladino G. Peptidome Profiling of Induced Sputum by Mesoporous Silica Beads and MALDI-TOF MS for Non-Invasive Biomarker Discovery of Chronic Inflammatory Lung Diseases. Proteomics 2011; 3402–3414.
9. Barış Y. Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. Toraks Dergisi 2002; 3: 338-340.

10. Kocabaş A. Akciğer Tüberkülozu Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevleri 2008; 3. Baskı: 538-540.
11. Gustafson P, Gomes V, Rabna P. Tuberculosis in Bissau: Incidence and Risk Factor in an Urban Community in Sub-Saharan Africa. *Int. J. of Epidemiology* 2004; 163-172.
12. Unat E.K. Osmanlı İmparatorluğunun son 40 Yılında Türkiye'nin Tüberküloz Tarihçesi üzerine. *Cerrahpaşa Tıp Fak. Dergisi* 1979; 10(4); 273-284.
13. Koçoğlu F. Verem Savaşı. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Yayını. 1986; 36–86.
14. Köksalan O. Kord Oluşturma, BACTEC NAP Testi ve Biyokimyasal İdentifikasyon Yöntemlerinin Karşılaştırması ve İstanbul'da Mikobakteri Suşlarının Türlerine Göre Dağılımı. İstanbul Üni. Tıp Fakültesi, İstanbul, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık tezi 1999.
15. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, & Winn WC Jr. *Mycobacteria. In Color Atlas And Textbook of Diagnostic Microbioloy. 5 th . Ed. USA. Lippincott-Raven publishers, 1997:893-952.*
16. Kıyan M, Cengiz A.T. *Mycobacteriaceae*. Ed: Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitapevi, 1999; 419-455.
17. Piersimoni C, Dawson D. *Mycobacterial Terminology*. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38; 3913.
18. Özkara Ş, Akta Z, Özkan S. *Dünyada Türkiyede Durum. Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı*. TC. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı 2003. Ankara.

(www.verem.org.tr/pdf/tum-kitap.pdf)

19. The PIH Guide to the Medical Management of Multidrug-Resistant Tuberculosis. International Edition. Partners in health, 2003.
20. Cegielski J, Chin D, Espinal M. The Global Tuberculosis Situation Progress and Problems in the 20th Century, Prospects for the 21st Century. *Infection Disease Clin.* 2002 Mar; 16(1); 1-58.
21. Jarzembowski JA, Michael B, Young MD. Nontuberculous Mycobacterial Infection. *Arch. Pathol Lab. Med* 2008; 132: 1333–1341.
22. Günaydın M, Yanık K. Distribution of Nontuberculous Mycobacteria Strains. *Annals of Clin. Microbiol. and Antimicrobials*, 2013; 1476.
23. Seber E. Tüberkülozun Dünü. *Ankem derg.* 2010; 24 (ek 2): 52-60.
24. Moore JE, Kruijshaar R ME, Ormerod LP. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England 1995-2006. *BMC Public Health* 2010; 10: 612.
25. Hong-xiu W, Jun Y. Nontuberculous Mycobacteria: Susceptibility Pattern and Prevalence Rate in Shanghai From 2005 to 2008. *Chin Med J.* 2010; 123(2): 184–187.
26. Huang CT, Tsai YJ, Shuu CC. Clinical Significance of Isolation of Nontuberculous Mycobacteria In Pulmonary Tuberculosis Patients. *Respir Med* 2009; 103: 1484–1491.
27. Hosker HS, Lam CW, Chan SL. The Prevalence and Clinical Significance of Pulmonary Infection due to Non-tuberculous mycobacteria in Hong Kong. *Respir Med* 1995; 89: 3–8.
28. Ergin M, Kocagöz T, Us D. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Enzim Analizi ile Mikobakterilerin Tür Düzeyinde Tanımlanması. *Mikrobiyol. Bült.* 1999; 33: 251–261.
29. Bayram G, Emektaş G. Mikobakteri Türlerinin İdentifikasyonunda Polimerize Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi Tekniği İle klasik

Yöntemler Arasındaki Uyumun Belirlenmesi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim Dergisi 200; 1(3): 8-13.

30. Çavuşoğlu C, Turhan A, Yangın YE. Tüberkuloz Dışı Mikobakterileri İzolatlarının Tanımlanmasında Inno-Lipa Mycobacteria Inno-lipa Mycobacteria v2 ve Hsp65 Dizi Analizinin Karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2005; 39(4): 437–445.

31. Haas DW. Mycobacterial Disease. Ed: Mandell G, Bennett J. Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, Inc.; New York, NY.1995; 2214.

32. Bedir O. Hasta Örneklerinden İzole Edilen Tüberkuloz Dışı Mikobakterilerin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması. GATA, Ankara, Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık tezi, 2003.

33. Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML. Klinik Mikrobiyoloji. (Çev: Başustaoğlu A.) Atlas Kitapçılık 2009; cilt 1: 543-601. 1223-47.

34. Forbes B, Sham D, Weissfeld A. Bailey Scott's Diagnostic Microbiolog 2002; 11. Baskı; 538-571.

35 Kocagöz T. Mycobacterium Türlerinin Genel Özellikleri Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevleri 2008; 3. Baskı: 2277-2283.

36. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Mikrobiyoloji. Asya Kitapevleri 2005; 4.Baskı: 220-23.

37. Özkütük N. Mikobakteriler. Ed: Altındiş M. Hemşireler İçin Mikrobiyoloji Nobel Tıp Kitapevleri 2010; 217-228,

38. Metchock B, Nolte F, Wallace JR. Mycobacterium In Washington D.C. Ed: Jongensen J, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 1999; 7. Baskı; 399-437.

39. Özkara Ş, Tüberküloz. Ed: Kılıçaslan Z. Toraks Kitapları. İstanbul, 2010; 48-61.
40. Falkinham O. Epidemiology of Infection Nontuberculous Mycobacteria. Clin. Microbiology Rev. Apr. 1996; Cilt 9: 177-215.
41. Alp A. Mikobakteri Tanı ve İdentifikasyonunda Moleküler Yöntemler. 3. Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, s. 95-99. Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 2004.
42. Uzun M. Klinik Materyalin Hastadan Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi. 7. Tüberküloz Laboratuar Tanı ve Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı, s.12-25. Tübeküloz Sempozyumu, Bursa, 2008.
43. Lillian VL.Solid media for isolation. In: Isenberg HD (ed).Clinical Microbiology Procedure Handbook. 2nd ed. Washington, DC: Amerikan Society for Microbiology 2004; 731.
44. Parsons M, Somoskövi Á. Lab. Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Count. Clin. Mic. Rev, 2011; 24(2): 314-350.
45. Ersöz G, Arslan G. Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri. 21. YY'da Tüberküloz Sempozyumu Tüberküloz Lab. Tanı ve Yönt. Uygulamalı Kursu Kitabı. Türk Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu 2003;156-160.
46. Siddiqi SH. BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson and Company Maryland,USA, 1996.
47. BACTEC MGIT 960 System User Manual. Becton Dickinson Spark, Maryland USA, 1996.
48. Hain-Lifescience Company Manual Geno Type Mycobacturium CM/AS Moleculer Genetic Assay for Identication of the Clinacal Most Relevant Mycobacterial Species from Culture Material Manuel 2008; 16-29, www.hain-lifescience.com/products/msds.html.

49. Akyar I. Kütle Spektrometrisinin Mikrobiyolojide Kullanımı. Acıbadem Üni. Sağlık Bil Dergisi 2011; Cilt 2(Sayı 4): 177-183.
50. Reich M, Bosshard P, Stark M. Species Identification of Bacteria and Fungi from Solid and Liquid Culture Media by MALDI-TOF Mass Spectrometry. J. Bacteriol. Parasitol, 2013; 5-13.
51. Bader O. MALDI-TOF-MS Based Species Identification and Typing Approaches in Medical Mycology. Proteomics, Mar. 2013; 788–799.
52. Hain-Lifescience Company FluoroLyse verimli DNA İzolasyonu, 2008, [http:// www.hain-lifescience.com.](http://www.hain-lifescience.com/) / info@biomina.com.
53. Biomerieux Vitek MS Plus Workflow User Manuel, 29 July 2013.
54. Biçmen C, Gündüz Ayрыз. Klinik Örneklerden TBC dışı (atipik) Mikobakterilerin Araraştırılması: Retrospektif Değerlendirme (2009-2014). 8. Moleküler Kongresi Kitabı, s.143. Moleküler Kongresi, Ankara, Haziran 2014;
55. Özyurt M. Akciğer ve Akciğer Dışı Tüberküloz Tanısında Moleküler Yöntemlerin Kullanımı'. Mikrobiyoloji Bülteni, 2012; 46(2): 319-331.
56. Lonmann C, Sabou M, Moussaoui W. Comparison Between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS Systems for Yeast Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol., 2013 Apr; 6: 1231-1236.
57. Martiny D, Busson L, Wybo I. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS Systems for Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry J Clin Microbiol, 2012 Apr.; 1313-1325.
58. Hettick J, Kashon M, Simpson J. Proteomic Profiling of Intact Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Anal. Chem., 2004; Cilt 76: 5769–5776.

59. Pignone Mi, Kimberly M., Cooper J. Identification of Mycobacteria by Ionization-Time-of-Flight Mass Matrix-Assisted Laser Desorption Spectrometry. *Clin. Microbiol.*, 2006; 44(6): 1963.
60. Lotz A, Ferroni, Beretti J. Rapid Identification of Mycobacterial Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 13 October 2010; *Cilt* 48(12): 4481.
61. El KA, Couderc C, Flaudrops C. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification of Mycobacteria in Routine Clinical Practice. *Universite´de la Me´diterrane et Poˆle de Maladies Infectieuses*, September 2011; Vol6: 24720.
62. Paul S, Drake S, Murray P. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry *J. Clin. Microbiol.*, 16 March 2011; 1790-1794.
63. Balada M, Kamboj K, Pancholi P. Identification of Mycobacteria from Solid and Liquid Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory’. *J. Clin. Microbiol.* September 2013; vol. 51: 2875-2879.
64. Chen H, Yam C, Yuen K. Advantages of Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry as a Rapid Diagnostic Tool for Identification of Yeasts and Mycobacteria in the Clinical Microbiological Laboratory *J. Clin. Microbiol.*, 2013; *Cilt* 51 (12): 3981-3987.
65. Mather C, Ivera F, Butler S. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Mycobacteria Using Simplified Protein Extraction Protocols. *J. Clin. Microbiol.*, October 2013; 52(1): 130.
66. Machen A, Kobayashi M, Connley R. Comparison of Heat Inactivation and Cell Desorption Ionization Time of Flight Mass Use of Vitek Matrix-Assisted Laser Mycobacteria from Solid Culture Media by Disruption

Protocols for Identification of Spectrometry. J. Clin. Microbiol., September 2013; 51(12): 4226.