



Orijinal Araştırma

Klinik Örneklerden İzole Edilen Mikobakteri Suşlarının hsp65 PCR-RFLP Yöntemi ile İdentifikasyonu

● Ayşe Barış, ● Banu Bayraktar

Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Özet

Amaç: Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması, patojen olan türlerin patojen olmayanlardan ayrımı, uygun tedavi rejiminin seçimi ve epidemiyolojik verilerin toplanması için önemlidir. Geleneksel yöntemler ile laboratuvar tanısı zaman alıcı ve zahmetli olan mikobakterilerin identifikasyonu için daha hızlı, duyarlı ve güvenilir yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında *hsp65* Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) yönteminin, rutin laboratuvar kullanımı için uygunluğunun belirlenmesidir.

Yöntem: Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na üç yıllık dönemde gönderilen 1632 hastadan ardışık olarak toplam 141 mikobakteri izolatu üretilmiştir. İzolatların tanımlanmasında MGIT PNB, niasin testi ve moleküler yöntemlerden *hsp65* PCR-RFLP yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Kültürde üreyen mikobakterilerin konvansiyonel yöntemler ile 138'i *M. tuberculosis kompleks* (MTBC), üçü tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) olarak belirlenmiştir. *hsp65* PCR-RFLP yöntemi kullanılarak ise 137 izolat MTBC, dört izolat TDM olarak tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntem ile PNB duyarlı olduğu için MTBC olarak değerlendirilen bir izolat *hsp65* yöntemi ile TDM olarak belirlenmiştir. Tüberküloz dışı mikobakterilerin *hsp65* PCR-RFLP yöntemi ile identifikasyonunda bir izolat *M. abscessus*, üç izolat *M. avium* kompleks olarak tanımlanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda TDM'ler de dahil mikobakterilerin identifikasyonuna olanak sağlayan *hsp65* PCR-RFLP yönteminin kliniğe hızla bilgi vermek açısından, ucuz, kolay ve rutin kullanıma uygun bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *hsp65*; *M. tuberculosis kompleks*; PCR-RFLP; tüberküloz dışı mikobakteri.

Atıf için yazım şekli: "Barış A, Bayraktar B. Identification of the Mycobacterial Strains Isolated From Clinical Specimens Using *hsp65* PCR-RFLP Method. Med Bull Sisli Etfal Hosp 2020;54(3):364–370".

İnsanda en sık hastalık oluşturan mikobakteri türü, tüberküloz hastalığının etkeni olan *M. tuberculosis*'tir. Günümüzde dünya genelinde tüberküloz halen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya genelinde 2017 yılında 10 milyon yeni tüberküloz olgusunun görüldüğü, 1.3 milyon tüberkülozlu hastanın ve 300 000 HIV (+) hastanın tüberküloz nedeniyle öldüğü bildirilmiştir.^[1] Atipik ya da tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) ise 150'den fazla türe sahip olup, toprak, su gibi çevresel kaynaklarda ve su dağıtım sistemlerinde bulunmakta ve insanda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır.^[2] Hastane ortamlarında kontamine tıbbi malzemeler nedeniyle kaynaklanan sal-

gınlar da bildirilmiştir.^[3] Genellikle predispozan faktörlerin bulunduğu kişilerde inhalasyon yoluyla alınarak akciğer enfeksiyonlarına neden olmaktadır.^[4] Son yıllarda, TDM enfeksiyonlarının artma eğilimi gösterdiği^[2, 5] ve sıklıkla akciğer, lenfatik sistem, deri ya da kemik tutulumuyla ilişkili olduğu belirtilmektedir.^[4, 6]

Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması; uygun tedavi rejiminin seçimi ve epidemiyolojik verilerin toplanması için önemlidir. Klasik tanımlamada kullanılan biyokimyasal testlerin zaman alması ve yoğun emek gerektirmesi nedeniyle mikobakterilerin identifikasyonunda daha hızlı, duyarlı ve güvenilir yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Tanım-

Yazışma Adresi: Ayşe Barış, MD. Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Turkey

Telefon: +90 505 840 99 45 **E-posta:** aysebarisac@gmail.com

Başvuru Tarihi: 20.03.2019 **Kabul Tarihi:** 30.09.2019 **Online Yayınlanma Tarihi:** 04.09.2020

©Telif hakkı 2020 Şişli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni - Çevrimiçi erişim www.sislietfalthip.org

OPEN ACCESS This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).



lamada önceleri biyokimyasal özellikler, hücre duvarında bulunan mikolik asitlerin analizi kullanılırken son dönemlerde birçok moleküler yöntem, hibridizasyon temelli ticari problemler ve matris aracılı uçuş zamanlı kütle spektrometri yöntemleri geliştirilmiştir.^[7]

Moleküler yöntemlerden Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) yöntemi ucuz ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Bu yöntemle farklı gen bölgeleri (16S-23S rRNA, hsp65, rpoB) kullanılabilir.^[8-11] Ticari sistemlerden AccuProbe system (Hologic Gen-Probe, San Diego, CA), INNOLiPA Mycobacteria system (Fujirebio Europe, Ghent, Belgium), GenoType Mycobacterium system (Hain Lifescience, Nehren, Germany) yaygın kullanılan sistemlerdir. Ancak bu sistemlerle tanımlama süresi kısılırken, sınırlı sayıda tür tanımlanabilmesi, bazı problemlerde türlerin çapraz reaksiyon vermesi dezavantaj olmaktadır.^[12]

Hsp65 PCR-RFLP yönteminde, mikobakterilerin *hsp65* geninin belli bir bölgesi çoğaltılıp restriksiyon enzimleriyle kesilmekte ve elde edilen bant patternleri, tür saptama algoritmalarındaki referans türlerle karşılaştırılarak tanımlama yapılmaktadır. Bu çalışmanın amacı mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında *hsp65* PCR-RFLP yönteminin, rutin laboratuvar kullanımı için uygunluğunun belirlenmesidir.

Yöntem

Hastanemiz klinik mikrobiyoloji laboratuvarına üç yıllık dönemde tüberküloz şüphesi ile gönderilen 1632 hastaya ait klinik örneklerden, her biri tek hastaya ait olmak üzere ardışık olarak üretilen 141 mikobakteri izolatuvarına dahil edildi. Laboratuvara gönderilen steril olmayan örnekler, NaOH-Nalc yöntemi ile dekontaminasyon- homojenizasyon-konsantrasyon işlemleri uygulandıktan sonra, steril olduğu düşünülen örnekler ise direkt olarak kültür için Mycobacterial-Growth Indicator Tubes (MGIT) ve Lowenstein-Jensen (LJ) besiyerlerine ekildi. Mikroskopik inceleme için Erlich Ziehl Neelsen boyama kullanıldı. Üreme saptanan ve aside dirençli boyanma özelliği gösteren izolatların MTBC ve TDM ayrımı biyokimyasal testlerden Niasin test strip (BD BBL Taxo TB Niacin Test Strips) ve MGIT- PNB (p-Nitrobenzoik asit) duyarlılık deneyleri uygulanarak ve sonuçları birlikte değerlendirilerek yapıldı. PCR-RFLP yöntemiyle MTBC-TDM ayrımının yanı sıra TDM'lerin tür tanımlanması için kalite kontrol amacıyla *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) suşu kullanıldı. Testlerin cihaz kurulumu ve sarf malzemelerinin maliyet analizi incelendi.

Niasin Test

Niasin testi üretici önerileri doğrultusunda uygulandı. 1.5 ml steril distile su, aktif üreme fazındaki (üç-dört haftalık) LJ

besiyerine aktarıldı. Kolonilerden besiyerine salınan niasini elde edebilmek için öze yardımı ile koloniler besiyerinden hafifçe kazınarak 20-30 dakika eğik pozisyonda bekletildi. Sürenin sonunda bu solüsyondan 600'er µl alınarak kontrol ve test tüpü olarak işaretlenmiş tüplere eklendi. Niasin sribi (Becton Dickinson BBL Taxo TB Niacin Test Strips) test tüpüne, ok işareti aşağı gelecek şekilde yerleştirilerek tüplerin ağzı kapatıldı ve hafifçe çalkalandı. 5-10 dakika sonra tekrar hafifçe çalkalandı ve 15 dakika sonra test sonucu değerlendirildi. Renksiz görünüm niasin negatif, sarı renk varlığı niasin pozitif olarak değerlendirildi.

MGIT PNB (p-Nitrobenzoik asit) Deneyi

Pozitif MGIT tüpünden 1 ml sıvı alınıp 4 ml steril serum fizyolojik içeren tüpe aktarılarak 1:5 oranında dilüsyon yapıldı. İki adet MGIT tüp besiyeri alınarak birinci tüp kontrol, diğer tüp PNB çalışılmak üzere test tüpü olarak işaretlendi. Aseptik şartlarda 500 µl MGIT OADC çözeltisi her iki tüpe, 100 µl %4 PNB çözeltisi ise sadece test tüpüne eklendi. Dilüe edilmiş bakteri süspansiyonundan 500 µl her tüpe ilave edilip çalkalandı. Aynı zamanda bakteri süspansiyonundan kontaminasyon kontrolü amacıyla kanlı agar besiyerine pasaj yapıldı. Tüpler 37 °C'de inkübe edildi. Kontrol tüpü günlük olarak MGIT cihazında değerlendirildi ve pozitif olarak okunduğu ilk günden itibaren test tüpü değerlendirilmeye alındı. Üçüncü günün sonunda PNB içeren tüpte floresan saptanması durumunda üreyen mikobakteri TDM olarak, floresan saptanmaması durumunda ise *M. tuberculosis* kompleks olarak değerlendirildi.^[13]

DNA Ekstraksiyonu

Üreme saptanan MGIT tüp besiyeri 1 dk vorteksledi. Steril pastör pipeti ile 500 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüpüne konuldu. 80 °C'de 10 dakika kuru ısı bloğunda bakterilerin inaktivasyonu sağlandı. 5 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü ve üstteki sıvı atıldı. %10'luk Chelex 100 karışımından her kullanım öncesinde vortekslenerek 250 µl ependorfa ilave edildi. 10-15 sn vorteksledi. Kuru ısı bloğunda 60 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Tekrar 10-15 sn vorteksledi. Kuru ısı bloğunda 100 °C'de 15 dakika inkübe edildi ve oda ısısında soğumaya bırakıldı. Üç dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Mycobacterium DNA'sını içeren süpernatant başka bir ependorfa aktarıldı. PCR işlemi için kullanılmaya kadar -70 °C'de muhafaza edildi.^[14]

DNA Amplifikasyonu ve Restriksiyon Enzimi ile Kesim

Mikobakterilerin PCR- RFLP yöntemi ile identifikasyonu için, hedef bölgeye uygun primerlerin ve restriksiyon enzimlerinin seçiminde, Telenti ve ark.'nın^[8] yapmış olduğu çalışma kaynak olarak kullanıldı. *Hsp65* geninin çoğaltılıp

ması için PCR karışımı içerisine; 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 M (herbiri) deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (Promega), her bir primerden 50 pmol (Tb11 =5-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3] ve Tb12 =CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3]), 1 U Taq DNA polimerase (Promega) eklenerek PCR tüplerine 45 µl dağıtıldı. Elde edilen bakteri DNA'sından 5 µl eklenerek 50 µl final konsantaryon elde edildi. PCR işlemi için; 94 °C 'de 5 dakika; 94 °C 'de 1 dakika, 60 °C 'de 1 dakika ve 72 °C 'de 1 dakika olacak şekilde 30 döngü; 72 °C 'de 10 dakika olacak şekilde sıcaklık döngüleri MyCycler™ (Bio-Rad, ABD) ısı döngü cihazında ayarlandı. Uygun hedef DNA bölgesinin bantlarının (440baz çifti) görüldüğü örnekler; 2 µl 10X RE buffer, 0.2 µl Acetylated BSA, 1 µl Restriksiyon Enzimi, 10 µl PCR ürünü ve distile su ile 20 µl'ye tamamlanarak BstEII enzimi (Promega) için 60 °C 'de 2.5 saat, HaeIII enzimi (Promega) için 37 °C 'de 2.5 saat süreyle kuru ısı bloğunda veya ısı döngü cihazında inkübasyon sağlandı. Restriksiyon enzimleriyle kesim işleminden sonra elde edilen ürünlerin görüntülenmesi için; %2 agaroz jel (AppliChem, Germany) hazırlandı ve *M. tuberculosis* kompleks suşları belirlendi. Tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlanması için %3'lük NuSieve GTG Agarose (Cambrex, USA) jel kullanıldı. Oluşan bant büyüklükleri ϕ X174 DNA/Hinf I DNA (Fermentas) ve DNA 100bp ladder molekül ağırlık standartı ile karşılaştırılarak belirlendi. İzolatların belirlenen bant paternleri ile çalışmalardaki algoritmalar^[8, 9, 15] birlikte değerlendirilerek tür tanımı yapıldı.

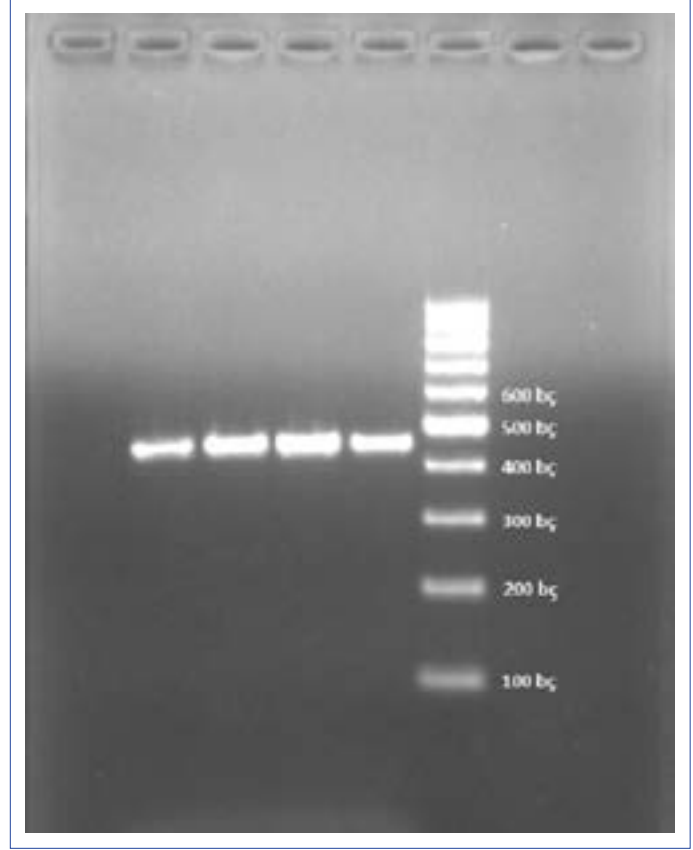
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımlı gruplarda oranların karşılaştırmaları Mc Nemar Analizi ile yapıldı. Sonuçların uyumunu Cohhen' Kappa uyum testi ile analiz edildi. Alfa anlamlılık seviyesi $p < 0.05$ olarak kabul edildi

Bulgular

Kültüründe mikobakteri üretilen 141 hastanın yaş aralığı 0–81 olup, bunların %33'ünü (0-18) yaş, %35'ini (19-49) yaş grubu oluşturmaktadır. Mikobakteri izolatları; 44 balgam, 32 mide açlık sıvısı, 24 apse, 14 biyopsi, 10 beyin omurilik sıvısı, yedi periton, dört plevra, dört idrar ve bir bronkoalveolar lavaj örneğinden üretildi. Niasin test ile 137 izolat pozitif, dört izolat negatif ; PNB test ile 138 izolat duyarlı, üç izolat dirençli olarak değerlendirildi.

Hsp65 gen bölgesinin çoğaltılması sonucunda elde edilen 441 baz çifti (bç) uzunluğundaki DNA bölümünün, BstEII enzimi ile kesimi sonucunda 231-116-79 bç; HaeIII enzimi ile kesimi sonucunda 152-127-69 bç uzunluğunda DNA parçaları oluşturan 137 izolat *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanmıştır (Şekil 1, 2). *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan

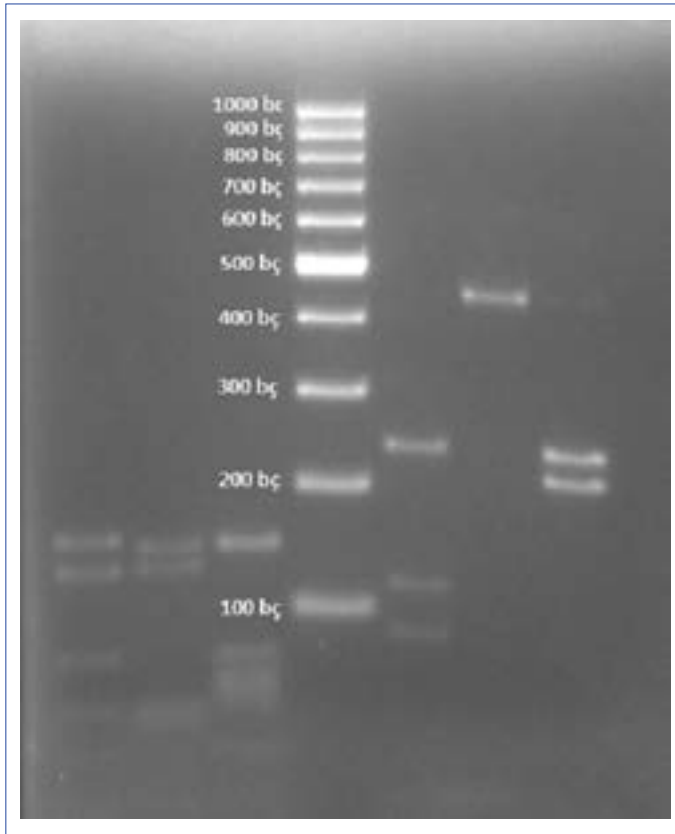


Şekil 1. *hsp65* geni (440 bç).

lanan kökenler niasin testi pozitif, PNB duyarlı bulunmuştur. İzolatların tanımlanmasında Niasin testi ve PCR RFLP yöntemi ile elde edilen sonuçlar %100 uyumlu bulundu (Kappa=1.000 $p=1.000$). PNB testi hassas olduğu için MTBC olarak değerlendirilen bir izolat, PCR-RFLP yöntemi ile TDM olarak tanımlanmıştır (Kappa=0.854 $p=1.000$). PCR RFLP yöntemi ile TDM olarak belirlenen izolatların *BstEII* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleriyle kesimleri sonucunda oluşan bantlar değerlendirilerek; üç izolat *M. avium-intracellulare* grup (MAC), bir izolat ise *M. abscessus* olarak tanımlanmıştır. TDM izolatlarına ait özellikler Tablo 1'de gösterilmiştir. Testlerin yaklaşık maliyetleri incelendiğinde biyokimyasal testlerden Niasin test için 3 \$, PNB test için 5 \$, PCR-RFLP yöntemi için 4 \$ maliyet hesaplandı.

Tartışma

Tüberküloz, insanlık tarihinin en eski hastalıklarından birisidir. Sebebinin kesin olarak bilinmesine ve tedavisinin mümkün olmasına rağmen günümüzde halen yaygın ve mortalitesi yüksek olan bulaşıcı bir hastalıktır.^[16] Tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonlarında ise son yıllarda artış olduğu görülmektedir.^[5, 17] Özellikle risk faktörlerinin bulunduğu kişilerde mortalitesi yüksek olup, türlerin dağılımı jeografik değişiklik göstermektedir.^[18] TDM türleri birçok antibiyotik ve dezenfektanlara karşı dirençlidir.^[2] MTBC/TDM ayrımı



Şekil 2. hsp65 geninin BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleriyle kesimi.

nın ve tür tanımının doğru yapılması uygun tedavi stratejisinin geliştirilmesinde önemlidir. Akciğer enfeksiyonu olan dört hastada etkenin makrolidlere dirençli olan *M. boletii* yerine *M. abcessus* olarak yanlış tanımlanması sonucunda tedavide ilk seçenek olan klaritromisin 12 aylık kullanımı ile tedavi başarısızlığı bildirilmiştir.^[19]

Mikobakterilerin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmasında; üreme hızı, koloni yapısı, pigmentasyon oluşumu ve biyokimyasal yöntemler (niasin üretimi, nitrat redüksiyonu, Tween hidrolizi, üreaz, aril sülfataz, vs) kullanılmaktadır.^[7] Niasin testi MTBC izolatlarında (*M. bovis* ve *M. bovis BCG* ha-

riç), *M. simiae* türünde de pozitif sonuç verebilmektedir. Bu nedenle MTBC ön tanısında kullanılırken diğer yöntemler ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.^[20]

Kullanılan biyokimyasal yöntemlerden biri de, uygun besiyerleri içerisine eklenen inhibitör substratların varlığında üreme inhibisyonunun gözlemlenmesidir. Bu yöntemde kullanılan substratlardan biri olan p-nitrobenzoik asitin (PNB), 500µg/ml konsantrasyonunda TDM'ler üreyebilirken (dirençli), MTBC inhibe olmaktadır (duyarlı). Ancak çalışmamızdaki bir izolatta olduğu gibi TDM'lerin az da olsa bir kısmında PNB duyarlılığı^[13] yada MTBC izolatlarında PNB direnci bildirilmiştir.^[21, 22] PNB testi kullanılarak yapılan MTBC-TDM ayırımında; Sharma ve arkadaşları^[23] %99.05, Giampaglia ve ark.^[13] %99.4, bizim çalışmamızda da benzer oranlarda %99.2 doğrulukla tanımlama yapılmıştır. Testin raporlanması ortalama 4-11 gün sürmektedir.^[23] Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal deneylerin yoğun emek gerektirmesi, birkaç haftada (4-8 hafta) sonuçlanması, düşük tekrarlanabilirlik göstermesi nedeniyle araştırmacılar daha kolay, hızlı ve güvenilirliği yüksek olan moleküler tanımlama yöntemlerine yönelmiştir.^[24] Ticari olarak mevcut problemlerle, ticari veya "in house" üretilen türe veya cinse özgü PCR ile gerçekleştirilen hibridizasyon aracılığı ile spesifik DNA paternlerinin saptanması temeline dayanan çeşitli identifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir; fakat bu yöntemler sadece belirli sayıda mikobakteri türlerini ayırt edebilmektedir ve rutin kullanım için maliyeti yüksektir.^[25] PCR RFLP yöntemi ise ilk olarak 1992 yılında yavaş üreyen mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılmış,^[26] izleyen birçok çalışmada mikobakteri türlerinin tanımlanmasında hızlı, kolay ve maliyet etkin bir yöntem olduğu belirtilmiştir.^[8, 9, 27-29] PCR-RFLP yönteminin biyokimyasal testler ile uyumunun araştırıldığı bir çalışmada, *M. tuberculosis* için %100, yavaş üreyen mikobakteriler için %83.3, hızlı üreyen mikobakteriler için %98.8 uyum saptanmıştır.^[27] Chimara ve ark.^[28] mikobakterilerin tür tanısında *hsp65* PCR-RFLP yöntemini, biyokimyasal deneyler ile karşılaştırarak 434 suşun 321'ini her iki yöntemle uyumlu olarak ta-

Tablo 1. Kültürde üretilen TDM izolatlarının özellikleri

TDM tür	Örnek	EZN	PNB Test	BstEII Pattern	HaeIII Pattern	Gönderildiği Birim
M. abcessus	Balgam	Pozitif	D	231-210 bç	145-69-58-52-48 bp	Göğüs Hastalıkları
MAC	Balgam	Negatif	D	440 bç	145-127-42-40 bp	Göğüs Hastalıkları
MAC	Balgam	Negatif	H	440 bç	145-127-42-40 bp	Pedatri
MAC	BOS	Negatif	D	440 bç	145-127-42-40 bp	Enfeksiyon Hastalıkları

TDM: Tüberküloz dışı mikobakteriler; MAC: M.avium kompleksi; BOS: Beyin Omurilik Sıvısı; EZN: Erlich Ziel Nelsen boyama; PNB: Para nitro benzoik asit duyarlılık testi; bç: baz çifti.

nımlamıştır. Uyumsuz bulunan 113 suş, *hsp65* gen sekans analizi ile tanımlanmış ve 71'i *hsp65* PCR-RFLP sonuçları ile uyumlu bulunmuş, 12 suşta ise PCR-RFLP yöntemi ile yanlış tanımlama yapılmıştır. Diğer 30 izolatta daha önce tanımlanmayan 13 yeni PCR-RFLP paterni belirlenmiştir. Benzer bir çalışmada 50 izolatin 43'ünde biyokimyasal deneyler ve *hsp65* PCR-RFLP yöntemi uyumlu sonuç vermiştir. Uyumsuz yedi izolatin 16S rRNA sekans analizi ile doğrulanmasında ise iki izolat PCR-RFLP ile aynı sonucu vermiştir.^[29] Sekans analizi ve PCR RFLP yöntemleri kullanılarak tanımlama yapılan bir çalışmada ise PCR-RFLP yöntemi ile izolatların ancak %30'unun tanımlanabildiği, yaygın görülen türlerde (*M. fortuitum*, *M. avium-M.intracellulare* gibi) iki yöntemle uyumlu sonuç alınırken, aynı restriksiyon paternine sahip farklı türlerin olması yada restriksiyon paterni bilinmeyen yeni türlerin bulunması nedeniyle tanımlama yapılamamıştır.^[19] Çalışmamızda MTBC-TDM ayrımında 140 izolat (%99.2) her iki yöntemle uyumlu olarak tanımlanmış olup uyguladığımız biyokimyasal testler ile (niasin ve PNB test) sadece MTBC-TDM ayrımı yapılmıştır. TDM tür tanımı için ilave birçok biyokimyasal testin yapılması gerekmektedir.

Hsp65 PCR-RFLP yönteminin önemli bir zorluğu, agaroz jel elektroforezi ile değerlendirme yapılırken, yakın büyüklükteki bantların ayrımının oldukça zor olması ve 60 baz çiftinden (bc) daha küçük olan bantların mikobakterilerin ayrımında kullanılamamasıdır.^[30] Yapılan bir çalışmada 43 referans tür ve 65 klinik izolat *hsp65* PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanmış ve küçük DNA parçalarının görüntülenebilmesinde NuSieve agarın oldukça faydalı olduğu ve poliakrilamid jele kıyasla daha kullanışlı olduğunu vurgulamıştır.^[9] Çalışmamızda yaptığımız ön deneyler ile *M. tuberculosis* kompleks'in %2 agaroz jel ile değerlendirilmesinde herhangi bir zorluk yaşanmamıştır. Bu nedenle maliyet açısından daha uygun olduğu ve suşlarımızın çoğunluğunu MTBC kökenlerinin oluşturması nedeniyle, MTBC ayrımında %2'lik agaroz jel kullanılması, TDM'lerin tanımlanmasında ise küçük DNA bantlarının daha iyi gözlenebilmesi için NuSieve agarın tercih edilmesinin faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

Klinik mikobakteriyoloji laboratuvarlarında üretilen mikobakterilerin büyük çoğunluğunu *M. tuberculosis* kompleks oluşturmaktadır. Ancak tüberküloz dışı mikobakterilerin sıklığında artış olduğu görülmektedir. TDM'ler tüm mikobakteriyel enfeksiyonların %0.5-30'undan sorumlu tutulmaktadır.^[5, 18, 31] Ülkemizde mikobakterilerin tanımlanmasında *hsp65* PCR-RFLP yönteminin kullanıldığı çalışmalarda en sık saptadıkları etken (%83-%87.5) MTBC'dir.^[31-34] TDM türlerinin dağılımında ise farklılıklar olup; Tarhan ve ark'ının^[32] çalışmasında *M. scrofulaceum* (%5), *M. gordonae* (%3.75), Ağaçayak'ın^[33] çalışmasında *M. scrofulaceum* (%8), *M. avium* (%4) ve *M. intracellulare* (%2); Çiftçi'nin^[34] çalışmasında *M.intracellulare* (%4.9) ve Bayram ve Emekdaş'ın^[35]

çalışmasında *M. fortuitum* (%16) en sık saptanan türlerdir. Ülkemiz dışında 30 farklı ülke ve 62 merkezden toplanan pulmoner örneklerin dahil edildiği bir çalışmada ve Avrupa Birliği üyesi 10 ülkenin katıldığı klinik örneklerin dahil edildiği başka bir güncel çalışmada TDM türleri içinde en sık *M. avium* kompleks (MAC) izole edilirken bunu *M. gordonae* ve *M. xenopi*'nin izlediği görülmektedir.^[6, 18] Çalışmamızda mikobakteri suşlarımızın %97'si *M. tuberculosis* kompleks iken %3'ü TDM olarak saptanmıştır. TDM izolatları arasında dünya ve ülkemiz verileri ile uyumlu olarak en sık *M. avium-intracellulare* grup (MAC) izole edilmiştir.

Mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu için kullanılan yöntemlerin maliyet analizinin yapıldığı bir çalışmada, *hsp65* PCR-RFLP yöntemi gerek kurulum aşamasındaki cihazlar, gerekse hasta başına düşen test maliyeti açısından GLC, HPLC, AccuProbe gibi yöntemlere göre maliyet etkin bir yöntem olarak bulunmuştur. Sarf malzeme ve test reaktifleri hesaplandığında PCR RFLP yöntemiyle tür tanımı için 1.2 \$, niasin test ve PNB testin birlikte kullanımı ile MTBC-TDM ayrımı için 0.9 \$ maliyet bildirilmiştir.^[36] Bir diğer maliyet analizi çalışmasında ise balgam örneği direkt olarak kullanılarak PCR RFLP yöntemi ile MTBC-TDM ayrımı ve bunların tür tanımının örnek başına maliyeti 6\$ olarak belirlenmiştir.^[37] Çalışmamızda biyokimyasal testler ile sadece MTBC-TDM ayrımı yapılmış ve maliyetleri yaklaşık niasin test için 3 \$, PNB test için 5 \$; PCR -RFLP yöntemiyle ise MTBC-TDM ayrımının yanısıra TDM'lerin tür tanımı yapılmış ve maliyeti yaklaşık 4 \$ olarak hesaplanmıştır.

Bu yöntemler, test başına düşen zaman açısından incelendiğinde ise yine en avantajlı yöntem *hsp65* PCR-RFLP yöntemi olarak belirtilmiştir.^[36] MTBC-TDM ayrımında niasin test ile aynı gün, PNB test ile 4-11 gün,^[23] PCR-RFLP yöntemiyle ise 24-48 saatte sonuç alınabilmektedir.^[36] TDM izolatlarının tür tanımının yapılabilmesi için ilave bir çok biyokimyasal testin birlikte kullanımı, yoğun iş yükü ve ortalama 4-8 hafta gibi bir süre gerekmektedir.^[24, 36] PCR-RFLP yönteminin avantajı ise MTBC-TDM ayrımının yanısıra iki günde tür düzeyine kadar tanımlama yapılabilmesidir.^[36] Çalışmamızın kısıtlı yönlerinden biri, TDM izolatlarının sekans analizi ile doğrulamasının yapılamamasıdır. Diğer bir kısıtlılık ise kullanılan biyokimyasal testler ile TDM tür tanımının yapılamamasıdır. Ülkemizde TDM tür tanımı kısıtlı sayıda tüberküloz laboratuvarlarında yapılabildiği için epidemiyolojik veriler ve yöntem karşılaştırmalarında izolat sayısının fazla olduğu çalışmalara ihtiyaç vardır.

Gelişen teknoloji ile biyokimyasal deneylere göre daha hızlı ve daha doğru tanımlama yapılabilen, uygulaması kolay ve maliyeti diğer yöntemlere kıyasla düşük olan *hsp65* PCR-RFLP yönteminin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kullanılması fayda sağlayacaktır.

Açıklamalar

Etik Komite Onayı: Çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi etik kurulu tarafından onaylandı (karar numarası: 2332).

Hakemli: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Bildirilmemiştir.

Yazarlık Katkıları: Konsept – A.B., B.B.; Tasarım – A.B., B.B.; Kontrol – B.B.; Materyal – A.B.; Veri toplama ve/veya işleme – A.B.; Analiz ve/veya yorumlama – A.B.; Kaynak taraması – A.B.; Yazan – A.B.; Kritik revizyon – B.B.

Kaynaklar

- Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Available at: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Accessed Jul 24, 2020.
- Johnson MM, Odell JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis* 2014;6:210–20.
- Padoveze MC, Fortaleza CM, Freire MP, Brandão de Assis D, Madalosso G, Pellini AC, et al. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. *J Hosp Infect* 2007;67:161–7.
- Tortoli E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:906–10.
- Wu TL, Chia JH, Kuo AJ, Su LH, Wu TS, Lai HC. Rapid identification of mycobacteria from smear-positive sputum samples by nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2008;46:3591–4.
- van der Werf MJ, Ködmön C, Katalinić-Janković V, Kummik T, Soini H, Richter E, et al. Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. *BMC Infect Dis* 2014;14:62.
- Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:727–52.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31:175–8.
- Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1997;35:2969–73.
- Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, et al. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol* 2000;38:1094–104.
- Ong CS, Ngeow YF, Yap SF, Tay ST. Evaluation of PCR-RFLP analysis targeting hsp65 and rpoB genes for the typing of mycobacterial isolates in Malaysia. *J Med Microbiol* 2010;59:1311–6.
- Tortoli E, Pecorari M, Fabio G, Messinò M, Fabio A. Commercial DNA probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species. *J Clin Microbiol* 2010;48:307–10.
- Giampaglia CM, Martins MC, Inumaru VT, Butuem IV, Telles MA. Evaluation of a rapid differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with rho-nitrobenzoic acid and thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:206–9.
- Saniç A, Eroğlu C, Kizirgil A. PCR ve RFLP yöntemleri ile mycobacterium türlerinin identifikasyonu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu; 2003; Samsun; 2003. p 297–304.
- Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol* 1997;35:79–85.
- Kıyan M. Mycobacteriaceae. In: Ustaçelebi Ş, editor. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 419–55.
- Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med* 2015;36:13–34.
- Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al; Nontuberculous Mycobacteria Network European Trials Group. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J* 2013;42:1604–13.
- da Costa AR, Lopes ML, Furlaneto IP, de Sousa MS, Lima KV. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:390–4.
- Richter E, Brown-Elliott BA, Waalece RJ. Mycobacterium: Laboratory characteristics of slowly growing Mycobacteria In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Washington,DC: ASM Press; 2011. p. 503–24.
- Shenai S, Rodrigues C, Mehta A. Time to identify and define non-tuberculous mycobacteria in a tuberculosis-endemic region. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:1001–8.
- Rodrigues C, Shenai S, Sadani M, Sukhadia N, Jani M, Ajbani K, et al. Evaluation of the bactec MGIT 960 TB system for recovery and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a high through put tertiary care centre. *Indian J Med Microbiol* 2009;27:217–21.
- Sharma B, Pal N, Malhotra B, Vyas L. Evaluation of a Rapid Differentiation Test for *Mycobacterium Tuberculosis* from other Mycobacteria by Selective Inhibition with p-nitrobenzoic Acid using MGIT 960. *J Lab Physicians* 2010;2:89–92.
- Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996;34:296–303.
- da Silva Rocha A, da Costa Leite C, Torres HM, de Miranda AB,

- Pires Lopes MQ, Degraive WM, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. *J Microbiol Methods* 1999;37:223–9.
26. Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA, et al. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1992;30:1815–22.
27. Cheunoy W, Prammananan T, Chaiprasert A, Foongladda S. Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: two amplified targets, hsp65 and rpoB, for identification of cultured mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51:165–71.
28. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol* 2008;8:48.
29. Martin A, Uwizeye C, Fissette K, De Rijk P, Palomino JC, Leao S, et al. Application of the hsp65 PRA method for the rapid identification of mycobacteria isolated from clinical samples in Belgium. *J Microbiol Methods* 2007;71:39–43.
30. Saifi M, Jabbarzadeh E, Bahramand AR, Karimi A, Pourazar S, Fateh A, et al. HSP65-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:723–8.
31. Al Houqani M, Jamieson F, Chedore P, Mehta M, May K, Marras TK. Isolation prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacteria in Ontario in 2007. *Can Respir J* 2011;18:19–24.
32. Tarhan G, Kogagöz T, Cesur S, Ceyhan İ. The place and importance of Pcr-Rflp Method in determination of *Mycobacteria* species in routine laboratory practice. *Adv Biotech & Micro* 2017;3:77–61.
33. Agacayak A, Bulut Y, Seyrek A. Detection of mycobacterium species distribution in the sputum samples of tuberculosis patients by PCR-RFLP method in Elazığ province. *Mikrobiyol Bul* 2007;41:203–9.
34. Çiftçi İH, Karakece E, Hızal S, Aydemir Y, Terzi HA. Comparison of different methods in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and atypical mycobacteria. *Acta Medica Mediterranea* 2015;31:819.
35. Bayram G, Emekdaş G. Determination of Coherency Between Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Technique and Conventional Methods for the Identification of *Mycobacteria* at the Species Level. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg* 2008;1:8–13.
36. Wong DA, Yip PC, Tse DL, Tung VW, Cheung DT, Kam KM. Routine use of a simple low-cost genotypic assay for the identification of mycobacteria in a high throughput laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:421–6.
37. Ratnatunga CN, Wickramasingha S, Thevanesam V, Athula Kumara KGR. Efficacy and Cost of Molecular Identification of Clinical *Mycobacterial* Isolates in a Resource Limited Setting. *SAARC J Tuberc Lung Dis HIV/AIDS* 2016;1:23–31.