



T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKROBakterİLERİN MALDI-TOF MS  
YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

Dr. Vugar HUSEYNOV

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2023



T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKROBakterİLERİN MALDI-TOF MS  
YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

Dr. Vugar HUSEYNOV

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Cüneyt ÖZAKIN

Bursa-2023

## İÇİNDEKİLER

Tablolar ve Şekiller .....	ii
Özet .....	iii
İngilizce Özet .....	iv
Giriş ve Amaç .....	1
Genel Bilgiler .....	3
Mikobakterilerin Genel Özellikleri .....	4
Mikobakteri Enfeksiyonlarında Tanı .....	6
Mikroskopi .....	6
Kültür .....	7
Biyokimyasal Testler .....	9
Moleküler tanımlama yöntemleri .....	11
Gereç ve Yöntem .....	15
Bulgular .....	19
Tartışma ve Sonuç .....	24
Kaynaklar .....	29
Ek-1: Araştırma İzinleri .....	35
Teşekkür .....	38
Özgeçmiş .....	39

## TABLolar VE ŞEKİLLER

### I. Tablolar

**Tablo 1:** Mikobakteri varlığını araştırmak üzere hazırlanan yaymaların değerlendirme kriterleri

**Tablo 2:** GenoType CM/AS ve MALDI-TOF MS sonuçlarının karşılaştırılması

**Tablo 3:** MALDI-TOF skorlarına göre mikobakteri türleri ve yüzdeleri

**Tablo 4:** Laboratuvara gönderilen klinik örneklerin dağılımı

**Tablo 5:** rneklerin referans laboratuvarında tanımlanma süresi

### II. Şekiller

**Şekil 1:** *Mycobacterium tuberculosis* Ziehl-Neelsen boyamada görünümü

**Şekil 2:** Mikobakterilerin hücre duvarı

**Şekil 3:** *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kültürü için kullanılan besiyerleri

## ÖZET

Son yıllarda tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) enfeksiyonlarında artış ve bu enfeksiyonların tedavilerinin tüberkülozdan farklı olması nedeniyle tür düzeyinde tanımlama gereklidir. Çalışmamızın amacı MALDI-TOF sisteminin *Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerin tanımlanmasında etkinliğini göstermek, suşların referans laboratuvarına gönderilip tanımlanıp raporlanması için geçen süre göz önüne alındığında daha hızlı klinisyene sonuç vermek ve bu metodun kurumumuzda rutin kullanımını sağlamaktır.

Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarındaki klinik örneklerden 2016-2021 tarihlerinde izole edilmiş Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarına gönderilerek tür tanımlaması yapılarak saklamaya alınmış 65 suş içinde canlandırılabilen 20 TDM suşu çalışmaya alınmıştır. Mikobakterilerin MALDI Biotyper numunesinin hazırlanması için Bruker Daltonik GmbH tarafından tavsiye edilen inaktivasyon ve ekstraksiyon prosedürü MycoEX yöntemi kullanılmıştır. Sonra MALDI-TOF sonuçları ile GenoType CM/AS kiti ile çalışılmış referans laboratuvarından gelen sonuçlar karşılaştırılmıştır. İki yöntem arasındaki uyum 20/20 (%100) olmuştur. Bir izolat GenoType CM/AS yöntemi ile *M. fortuitum* group olarak tanımlanmasına rağmen MALDI-TOF ile aynı grubun içinde yer alan tür *M. farcinogenes* olarak tanımlandığından uyumlu kabul edilmiştir. Yedi izolat >2,0; 2 izolat 1,8-2,0; 9 izolat 1,6-1,8; 2 izolat <1,6 skorla tanımlanmıştır.

Sonuç olarak MALDI-TOF yönteminin hızlı, kolay kullanılabilir ve güvenilir olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** TDM, GenoType CM/AS, MALDI-TOF MS

## SUMMARY

Due to the increase in non-tuberculous mycobacteria (NTM) in recent years and different treatment strategies other than tuberculosis, identification at the species level is necessary for NTM. The aim of our study is to demonstrate the effectiveness of the MALDI-TOF system in the identification of NTM, to provide faster results to the clinician when considering the time taken for the strains to be sent to the reference laboratory, identified and reported, and to ensure the routine use of this method in our institution.

Sixty-five NTM strains isolated from clinical samples between 2016 and 2021 at the Medical Microbiology laboratory of Bursa Uludag University Health Application and Research Center were sent to the National Tuberculosis Reference Laboratory and classified and stored, and 20 NTM strains that could be revived among them were included in the study. The MycoEX method, the inactivation and extraction procedure recommended by Bruker Daltonik GmbH, was used for the preparation of the MALDI Biotyper sample of mycobacteria. The MALDI-TOF results were then compared with the results from the reference laboratory studied with the GenoType CM/AS kit. The agreement between the two methods was 20/20 (100%). Although an isolate was identified as *M. fortuitum* group by GenoType CM/AS method, it was considered compatible because the species in the same group with MALDI-TOF was identified as *M. farcinogenes*. Seven isolates were identified with a score of >2.0, 2 isolates between 1.8-2.0, 9 isolates between 1.6-1.8, and 2 isolates with a score of <1.6.

As a result, it has been shown that the MALDI-TOF method is fast, easy to use and reliable.

**Keywords:** NTM, GenoType CM/AS, MALDI-TOF MS

## GİRİŞ VE AMAÇ

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve *Mycobacterium leprae* dışındaki mikobakteriler “Tüberküloz Dışı Mikobakteriler” (TDM) olarak adlandırılır (1). Son yıllarda immüdüşkün hasta sayısının artması ve Human Immunodeficiency Virus (HIV) pandemisine bağlı olarak TDM enfeksiyonlarında artış gözlenmiştir (2). Tüberküloz Dışı Mikobakteriler “atipik”, “çevresel” gibi isimlerle de adlandırılır. Su aerosolleri, özellikle duşların fazla kullanılması bu hastalığın artmasına sebep olmaktadır. TDM'nin neden olduğu hastalıkların çoğunluğu akciğeri sağlam kişilerde görülmekle birlikte akciğer savunmasındaki eksiklikler de akciğerde TDM hastalığı için en sık risk faktörüdür. Bunlar arasında geçirilmiş tüberküloz (TB), bronşektazi, silikoz, kistik fibroz ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) önemlidir (3). Etken olan mikobakteri türüne göre enfeksiyonların tedavisi ve kontrol önlemleri farklılık gösterdiğinden klinik örneklerden izole edilen TDM'ler hızlı ve güvenilir yöntemler ile tanımlanmalıdır (2,4). Konvansiyonel tanı yöntemleri kültüre bağlı olduğundan geç sonuçlanır ve tek başına kullanıldıklarında her zaman doğru sonuç vermezler. Hem de yeni türlerin tanımlanmasında yetersiz kalırlar. Bu sebepten bazı fenotipik özellikler şimdiye kadar önemini korumakla birlikte günümüzde daha çok moleküler yöntemler kullanılmaktadır (2).

Son yıllarda çoğalma özelliklerine ek olarak MPT 64 antijeninin varlığını gösteren kromatografik bir test de tanımlamada önemli bir katkı sağlamıştır. TDM olduğu anlaşılınca, “Line probe” ve “MALDI-TOF MS” (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) gibi yöntemler kullanılarak tür adları belirlenir.

Bu çalışmada Line probe ve MALDI-TOF yöntemleri karşılaştırılarak MALDI-TOF'un avantajlı ve dezavantajlı yönleri irdelenmiştir. Çalışmanın temel amacı tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlanmasında MALDI-TOF sisteminin etkinliğini göstermek, suşların referans laboratuvarına gönderilip tanımlanıp raporlanması için geçen süre göz önüne alındığında hızlıca

klinisyene dönüş yapma olanağı yaratmak ve bu metodun kurumumuzda rutin kullanımını sağlamaktır.



## GENEL BİLGİLER

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks tarafından oluşturulan bakteriyel bir hastalıktır (5). Tüberküloza neden olan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*'i 24 Mart 1882'de Robert Koch keşfetti. Bu zamana kadar, TB, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da yaşayan her yedi kişiden birini öldürüyordu. Koch'un keşfi, bu ölümcül hastalığın kontrol altına alınması ve ortadan kaldırılması yönünde atılan en önemli adımdır. Bir asır sonra, insanları veremin dünya çapındaki etkisi konusunda eğitmek için 24 Mart tarihi Dünya Verem Günü olarak belirlendi (6). Tüberküloz hastalığına tarihsel süreçte birçok isim verilmiştir. Yakaladığı insanı eriterek öldürdüğü için "Tüketim Hastalığı" (Consumption), hastaları soldurarak yok ettiği için "Beyaz Ölüm" veya "Beyaz Veba" (White Death; White Plaque) ve asırlar boyunca birçok kişinin yaşamına son verdiği için de "Ölümün Kaptanı" (Captain of the Death) adıyla bilinir. Romalılar hastalığa hırıltılı nefes alıp verme ve öksürükle balgam atma anlamında "Phthisis" adını koymuşlar, bu hastalıkla ilgilenen doktorlara da Ftizyolog demişler. Türkçede ise hastalık için "İnce Hastalık" en çok kullanılan tanımdır (7).

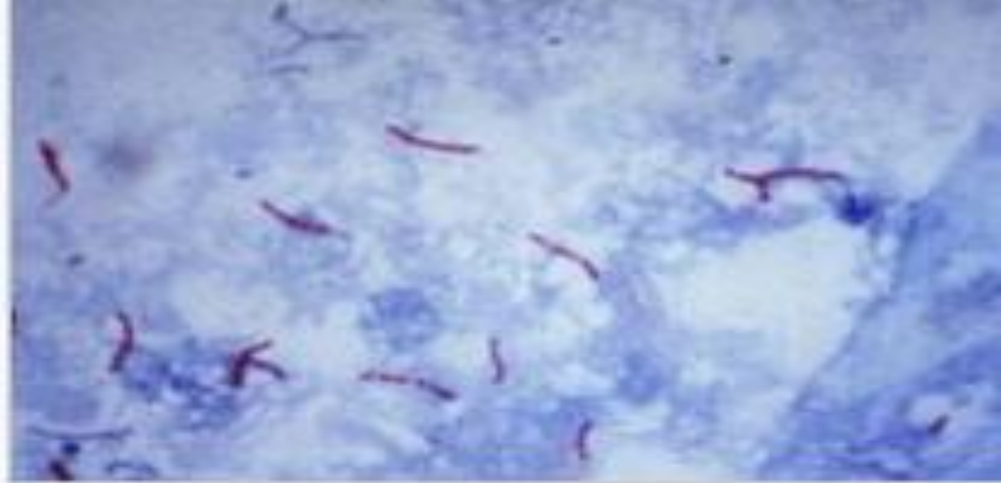
*Mycobacterium* cinsinin 150 milyon yıldan daha önce ortaya çıktığı varsayılabilir (8). Gutierrez ve ark. (9) *M. tuberculosis*'in erken bir atasının Doğu Afrika'da 3 milyon yıl kadar önce var olduğu sonucuna vardılar ve o dönemde erken hominidleri enfekte etmiş olabileceğini ileri sürdüler. Bununla birlikte, yalnızca *M. tuberculosis* değil, Afrika varyantları *Mycobacterium africanum* ve *Mycobacterium canettii* ile *Mycobacterium bovis* de dahil olmak üzere *M. tuberculosis* kompleksinin tüm modern üyelerinin (*M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* ve *M. orygis*) yaklaşık 15.000-35.000 yıl önce ortak bir Afrika atasına sahip olmaları muhtemeldir (9-11). Şu anda dolaşan türler, tümü Doğu Afrika'da bulunan altı ana soya ayrılmakla birlikte, küresel dağılımları değişir (12). *M. tuberculosis*'in bilinen mutasyon oranına dayanan analiz, bu suşlar arasındaki mevcut çeşitliliğin çoğunun 250 ila 1000 yıl önce ortaya çıktığını gösteriyor (13).

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışında kalan TDM'lerin yaklaşık 150 kadar türü olduğu ve bu bakterilerin yarısından çoğunun hastalık etkeni olduğu düşünülüyor. TDM'ler insanlarda pulmoner enfeksiyonlar, lenfadenit, yaygın enfeksiyonlar, lokalize deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, tendon-kemik-eklem enfeksiyonları ve kateter enfeksiyonları gibi önemli klinik tablolar oluşturur (14-17).

### **Mikobakterilerin genel özellikleri**

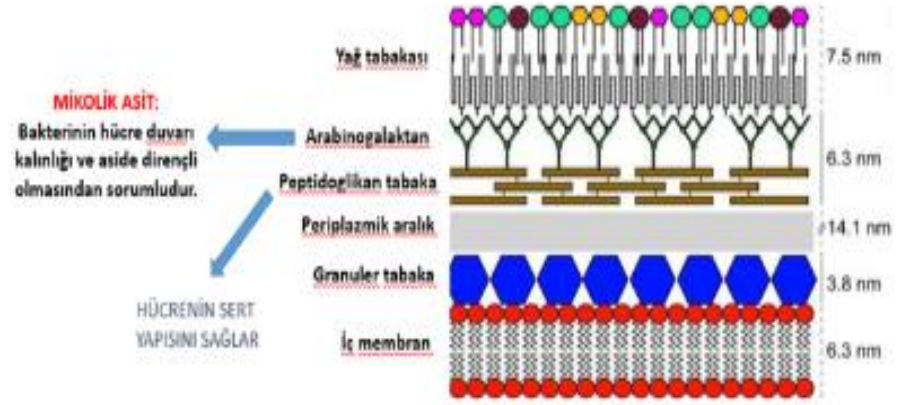
*Mycobacterium* cinsi bakteriler, filogenetik sınıflamada G+C içeriği yüksek, gram pozitif bakterilerin içinde bulunduğu Actinomycetales takımındaki, Mycobacteriaceae ailesi içinde yer alan tek cinistir. Halen dünya genelinde bir halk sağlığı sorunu olan TB ve lepra gibi önemli hastalıkların etkeni olmakla beraber doğada yaygın olarak bulunan çeşitli saprofit türleri yani TDM'leri de içermektedirler. Yeni laboratuvar yöntemlerinin ortaya çıkmasıyla birlikte çok sayıda yeni mikobakteri türü tanımlanmıştır (18, 19).

Mikobakteriler esas olarak aerob, spor oluşturmeyen, 0,2-0,6 x 1-10 µm boyutlarında, hareketsiz, hafif kıvrık veya düz basillerdir (Şekil 1) (18).



**Şekil 1:** *Mycobacterium tuberculosis* Ziehl-Neelsen boyamada görünümü (20).

Mikobakteriler kompleks yapıda ve lipitten zengin bir hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarının temel yapısı tipik gram pozitif bakterilerin hücre duvarına benzer; içte sitoplazmik membran ve onun üzerinde kalın bir peptidoglikan tabaka bulunur. Dış membran yoktur. Sitoplazmik membrandan köken alıp hücre duvarı boyunca uzanan lipoarabinomannan yapısı zarın en önemli elemanı olup bakteri virulansında büyük önem taşımaktadır (Şekil 2). Bu yapı üç formda bulunabilir: ManLam, fosfomiyoinositole bağlı LAM, AraLam. ManLAM virulan mikobakterilerde bulunmaktadır. ManLAM oksijen radikallerini bağlayarak onları inaktive eder (21-24).



Şekil 2: Mikobakterilerin hücre duvarı (25).

## **Mikobakteri Enfeksiyonlarında Tanı**

### **Mikroskopi**

Tanıda kullanılan en hızlı ve ucuz yol mikroskopidir. Yöntemin spesifitesi yüksektir, sensivitesi ise örneğin türü ve niteliğine, içerdiği bakteri miktarına, uygulanan tekniğe, uygulama ve değerlendirme yapanların tecrübesine bağlı olarak %20 ila 85 arasında değişmektedir. Mikroskopik incelemede asidorezistan boyama (ARB) pozitifliğini tespit etmek için yayma yapılan örneğin mililitresinde 5.000-10.000 bakteri bulunması gerekmektedir.

Mikobakteriler hücre duvarlarındaki hidrofobik özelliğinden dolayı suda çözünen boyalarla zor boyanırlar. Mikobakteriler hücre içine aldıkları boyayı asit-alkol çözeltisi ile bırakmadıkları için “asido-alkaliye-rezistan bakteri (ARB/AARB)” olarak adlandırılır.

Mikobakterilerin mikroskopik tanısında 2 tip boyama tekniği kullanılır.

Karbol fuksin boyama:

- Erlich Ziehl-Neelsen (EZN)
- Kinyoun

Florokrom (floresan) yöntemleri (Auramin O, auramin-rhodamin)

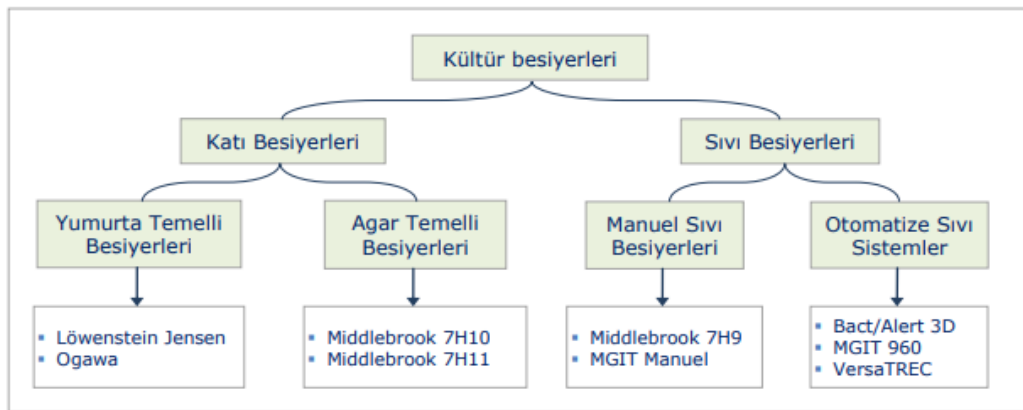
EZN boyamada ışık mikroskobu ile en az 300 alan incelenerek mavi zeminde kırmızı/pembe, düz ya da hafif kıvrık, tek tek veya kümeler halinde basiller aranır. Florokrom boyamada floresan mikroskopla  $\times 250$  büyütmede en az 30,  $\times 400$  büyütmede en az 70 alan incelenerek karanlık alanda, sarı / turuncu, düz ya da hafif kıvrık, tek tek veya kümeler halinde basiller aranır (26). Mikobakterilerin hazırlanan yaymadaki yoğunluklarına bağlı değerlendirme kriterleri Tablo 1’de sunulmuştur.

**Tablo 1:** Mikobakteri varlığını araştırmak üzere hazırlanan yaymaların değerlendirme kriterleri (26).

	Görülen ARB sayısı		
	Karbol fuksin boyama	Florokrom boyama	
	x1000	x250	x400
<b>Negatif</b>	0	0	0
<b>şüpheli, tekrar</b>	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
<b>1+</b>	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
<b>2+</b>	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
<b>3+</b>	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
<b>4+</b>	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/1 alan

## Kültür

Mikobakterilerin tanısında kültür altın standarttır. Kültürde mikobakterilerin üremesi için hasta numunelerinin mililitresinde 10-100 canlı basilin olması yeterlidir. Kültürde üremenin değerlendirme süresi 6-8 haftaya kadar uzayabilmektedir. Üreme için besiyelerinde özel maddelerin bulunması gerektiğinden seçici besiyelerine ihtiyaç duyulur (şekil 3) (26).



**şekil 3:** *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kültürü için kullanılan besiyeleri (26).

Yumurta bazlı besiyerleri tam yumurta veya yumurta sarısı, patates unu, tuzlar ve gliserol içerir ve koagülasyon ile katılaştırılır. Bu besiyerleri iyi bir tampon kapasitesine, uzun bir raf ömrüne (+4 - +10°C'de birkaç ay) sahiptir ve çoğu mikobakteri için üremeyi iyi bir şekilde sağlar. Ayrıca inokulum veya ortamdaki mikobakteriler için toksik olan maddeler nötralize edilir. Bu besiyerlerinin dezavantajları arasında, kullanılan yumurtaların kalitesine bağlı olarak farklılıklar, kolonileri kalıntılardan ayırt etmedeki zorluklar ve duyarlılık testi için ilave edilecek ilaçların doğru ve tutarlı konsantrasyonlarına ulaşamaması yer alır. Yumurta bazlı besiyerleri kontamine olduklarında sıvılaşabilirler (27, 28).

Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT), mikobakterilerin üremesini tespit etmek için floresan söndürme tabanlı bir oksijen sensörü (rutenyum pentahidrat emdirilmiş silikon kauçuk) ile birlikte modifiye edilmiş bir Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içerir. Ortamda başlangıçta bulunan büyük miktardaki oksijen, sensörün floresansını söndürür. Broth içinde mikobakterilerin veya diğer mikroorganizmaların büyümesi oksijeni tüketir ve tüpler 365 nm'de UV ışığı ile aydınlatıldığında indikatör parlak bir şekilde floresan verir.

Manuel versiyon için, UV ışık kaynağı olarak bir Wood lambası veya bir transillüminatör kullanılabilirken, otomatikleştirilmiş Bactec MGIT 960 sisteminde, tüpler cihaz tarafından sürekli olarak izlenir. Kullanımdan önce 7H9 besiyeri, mikobakterilerin büyümesini desteklemek için oleik asit-albümin-dekstroz ve kontaminantların büyümesini bastırmak için polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin (PANTA) ile desteklenir (29).

Kültürde üreyen mikobakterilerin hepsinin MTBC ve TDM ayrımı yapılmalıdır, çünkü mikobakteri enfeksiyonlarının çok büyük bir kısmında etken MTBC olduğundan tür tayininde asıl hedef MTBC'nin TDM'den ayrılması olmalıdır. İzolatların MTBC ve TDM olarak ayrımında üreme özellikleri, biyokimyasal testler kullanılmakla beraber, son yıllarda hızlı immünokromotografik ve genotipik yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır (26).

Tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlanmasında koloni morfolojisi, pigment üretimi, üreme hızı, üreme ısısının belirlenmesi ve biyokimyasal testler konvansiyonel yöntemler olarak uygulanırlar. Koloni morfolojisi farklı türler için ön bilgi verebilir ama birçok mikobakteri türünün koloni görünümüleri benzerlik gösterdiğinden güvenilirliği düşüktür (30).

Ernest Runyon 1959'da üreme hızlarına ve pigment üretme özelliklerine göre TDM'leri 4 grupta sınıflandırmıştır:

1. Fotokromojenler (ışıkta sarı pigment; yavaş üreme) *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*
2. Skotokromojenler (ışıkta ve karanlıkta sarı-portakal renkli pigment; yavaş üreme) *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium scrofulaceum*
3. Nonkromojenler (ışıkta çok az pigment veya renksiz; yavaş üreme) *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium terrae complex*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium xenopi*
4. Hızlı üreyenler (değişken pigmentasyon gösterirler) *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* (30, 31).

## **Biyokimyasal Testler**

### **Katalaz testi**

Bazı izoniazid dirençli *M. tuberculosis* ve *M. bovis* suşlarının dışındaki mikobakterilerin hepsi katalaz pozitifdir. Katalaz aktivitesi iki şekilde belirlenir: (a) Katalaz üretim miktarı (semikantitatif test): Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine 1 haftalık sıvı kültürden 0,1 mL ya da aktif olarak üreyen koloniden bir öze dolusu ekilir. 37°C'de 14 gün kapakları gevşek olarak inkübe edilir. Besiyerine 1 mL %30'luk hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. Oluşan hava kabarcığının besiyerinde oluşturduğu yüksekliğe göre karar verilir. Hava kabarcıklarının yüksekliğinin 45 mm altında olması negatif, 45 mm üstünde olması pozitif olarak değerlendirilir.

(b) 68°C'de ısıya stabil katalaz testi: Vida kapaklı bir tüpte 0,5 mL 0,067 M fosfat tamponundan (pH 7) yoğun bir bakteri süspansiyonu hazırlanır. Su

banyosunda ya da ısı bloğunda 68°C'de 20 dakika inkübe edilerek, oda sıcaklığında soğutulur. Tüpe 0,5 mL katalaz ayırıcı ilave edilir ve kapağı gevşekçe kapatılır, tüpler çalkalanmamalıdır. Beş dakika oda sıcaklığında bekletdikten sonra çok az kabarcık oluşması bile pozitif, hiç kabarcık oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilir (26).

### **Niasin birikim testi**

Tüm mikobakteriler üremeleri süresince nikotinik asit üretirler. *M. tuberculosis* ve *M. simiae* ile *M. chelonae*'nin bazı izolatları biyosentetik yollarında üretmelerine rağmen metabolize edemezler ve nikotinik asit ortama atılır. Niasin agarda birikir ve buradan ayrıştırılarak belirlenebilir (26, 32).

Löwenstein-Jensen besiyerinde yoğun olarak üreyen 28 günlük kültüre 1 mL steril distile su ya da SF ilave edilir. Steril bir öze ile agar yüzeyindeki kolonilerin, agara fazla zarar vermeden, kazınarak sıvı içerisine geçmeleri sağlanır. Sıvının besiyeri yüzeyini örtmesi için tüpler eğik bir şekilde 15 dakika bekletilir ve tüpteki sıvıdan 0,6 mL steril tüpe aktarılır. Sonra 15-20 dakika kadar beklenerek niasinin sıvıya geçmesi sağlanır. Sıvının rengine göre test yorumlanır; rengin sarıya dönmesi pozitif, değişmemesi ise negatif olarak değerlendirilir. Günümüzde niasin veya izoniazidi saptamak için strip testler bulunmaktadır (23,32).

### **Nitrat indirgenme testi**

Mikobakteriler nitratı redüksiyon etme kabiliyetlerine göre birbirinden ayrılır. Bu test, nitritin uygun reaktifler ile reaksiyona girdiğinde renk oluşumunun gösterilmesi prensibiyle çalışır. MTBC için nitrat indirgenme testi pozitifdir.

Tüplere 0,2 mL steril distile su ve üzerine 4 haftalık kültürden bir öze dolusu (~0,1 g) koloni ilave edilir. Sodyum nitrat çözeltisinden 2 mL ekleyerek karıştırılır ve 37°C'de 2 saat inkübe edilir. Süre sonunda; 1 damla ayıraç I, 2 damla ayıraç II, 2 damla ayıraç III konur. Pembeden koyu kırmızıya olan renkler pozitif olarak yorumlanır. Renk değişikliği olmazsa üzerine çinko tozu



ilave edilir pembe renk oluşursa–gerçek negatiftir. Rengi değişmezse pozitifdir (26).

Katalaz, niasin ve nitrat indirgenme testleri bir arada kullanılmalıdır, tek başlarına MTBC-TDM ayırımı yapamazlar.

### **p-Nitrobenzoik asit (PNB) testi**

*Mycobacterium tuberculosis* kompleksin (MTBC) saptanmasında 37°C’de p-nitrobenzoik asitli (PNB) besiyerinde üreme özelliği kullanılabilir. PNB, MTBC’nin üremesini seçici olarak inhibe eder. PNB testi *M. tuberculosis* komplekste negatiftir (26).

### **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Mikobakteri kültür izolatlarının tanımlanmasında, mikolik asitlerin ekstraksiyonu ve ayrıştırılmasına dayanan kimyasal bir yöntemdir. Uygulama zorluğu ve ekipman gereksinimi sebebiyle tüberküloz laboratuvarlarında yaygın kullanım alanı bulamamıştır (26).

### **Moleküler tanımlama yöntemleri**

Nükleik asit problemleri

Tüberküloz dışı mikobakteri türlerinin identifikasyonunda 16S rRNA’yı hedef alan akridinyum ester işaretli DNA problemler kullanılmaktadır. *M. avium*, *M. intracellulare*, *M.gordonae* ve *M. kansasii* için AccuProbe, Gen-Probe gibi ticari problemler vardır. Hem katı, hem de sıvı besiyerlerinde kullanılabilir. Hızlı, uygulanması kolay, sentivitesi ve spesifitesi yüksek yöntemdir. Problemlerin sadece birkaç tür için mevcut olması kısıtlayıcı yönleridir (4, 33).

Line prob

Line prob teknolojisi biyotin ile işaretli primerlerin kullanıldığı PZT ürünlerinin, nitrosellüloz şeritler üzerine bağlanmış özgün DNA problemleri ile hibridize edilmesi temeline dayanır (26). Inno LIPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Belçika) ve GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience,

Almanya) olmak üzere yaygın kullanılan iki farklı ticari sistem mevcuttur. Inno LIPA testi 16S-23S rRNA gen bölgesini hedef alır. Bu yöntem ile sık rastlanan 17 mikobakteri türü *M. tuberculosis* kompleks, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. fortuitum* kompleks, *M. malmoense*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. haemophilum*, *M. marinum*/*M. ulcerans* ve *M. celatum* saptanabilmektedir. Testin sensitivitesi %100, spesifitesi %94 olarak bildirilmiştir (2, 24, 33).

GenoType Mycobacterium yönteminde 23S rRNA'yı hedef alan multiplex PZT ve devamında line prob testinin kullanıldığı ters hibridizasyon işlemi uygulanmaktadır (2). Bu yöntem için geliştirilmiş çeşitli kitleler mevcuttur: Direkt hasta örneğinden *M. tuberculosis* kompleks ile dört farklı TDM'yi ayırt eden GenoType Mycobacteria Direkt Test kiti, *M. tuberculosis* kompleks üyelerini birbirinden ayırt eden GenoType MTBC kiti, *M. tuberculosis* kompleks'de çoklu ilaca direncini ve ikinci kuşak ilaçlara direnci tanımlayan GenoType MTBDR plus ve GenoType MTBDRsl kitleleri, sık rastlanan mikobakterileri ayırt eden GenoType Mycobacterium CM kiti ve az rastlanan mikobakterileri saptayan GenoType Mycobacterium AS kiti. CM kiti 27 ve AS kiti 19 TDM türünü tanımlamakla birlikte, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. gordonae*, *M. interjectum*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genovense*, *M. goodii*, *M. mucogenicum*, *M. heckeshornense*, *M. lentiflavum*, *M. szulgai*, *M. haemophilum*, *M. phlei*, *M. gastri*, *M. shimoidei*, *M. simiae* ve *M. asiaticum* gibi toplam 46 türü saptayabilmektedirler (34). Bu ticari problemler ile düşük oranda olsa da yanlış tanımlama sonuçlarının alınabileceği dikkate alınarak sonuçların bakterinin fenotipik özellikleri ile birlikte yorumlanması tavsiye edilmektedir (33, 35).

## **Polimeraz Zincir Tepkimesi ve Kesim Parçalarının Uzunluk Analizi(PZT-RFLP)**

Katı veya sıvı kültürden alınan izolatların hsp65 geninin bir parçasının önce PZR ile çoğaltılması sonra amplifiye ürünlerin BstEII ve HaeIII kesim enzimleri kullanılarak RFLP yöntemi uygulanır. Bu yöntemde hsp65 dışında rpoB, dnaJ ve 16S-23S rRNA gen dizileri de kullanılmaktadır. Testin iyi yönleri birçok türü saptayabilmesi ve pahalı donanım gerektirmemesidir (33).

### **DNA dizi analizi**

Deoksiribonükleik asit (DNA) dizi analizi yönteminde ilk hedef gen bölgesi PZT ile amplifiye edilir sonra amplikonların nükleotid dizileri otomatik dizileme cihazı kullanılarak bulunur. Mikobakterilerin tanımlanmasında da hedef gen bölgeleri kullanılmaktadır. Bu genler en sık 16S rRNA olmakla beraber 23S rRNA, ITS 1, *hsp65*, *rpoB* ve *gyrB* genleridir. TDM türlerinin tanımlanmasında A ve B bölgeleri olarak bilinen 2 değişken dizi değerlendirilir. GenBank, RIDOM, EMBL gibi çeşitli veri tabanları dizi analizi için kullanılmaktadır (33, 36).

### **Pirosekanslama**

Deoksiribo nükleik asit yapımı sırasında pirofosfat salınımını saptayan yeni bir yarı otomatize DNA dizileme yöntemidir. Pirosekanslama, *Mycobacterium* türlerinin tanımlanması için hızlı, basit ve ucuz bir moleküler yöntem olma avantajına sahiptir (2, 4, 37).

### **Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF MS)**

MALDI-TOF kütle spektrometresi, dünya çapında klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteriyel izolatların rutin olarak tanımlanması için bir referans yöntem haline gelmiştir. MALDI-TOF, parçacıkların iyonize edildiği, kütle-yük oranlarına göre ayrıldığı ve uçuş tüpünün bu sürenin sonunda iyonların bir dedektöre gitmesi için geçen sürenin belirlenerek ölçüldüğü

analitik bir tekniktir. Yüksek özgüllüğü, kullanıcı dostu olması ve ucuz olması ile birlikte 5 dakikadan daha kısa sürede güvenilir sonuçlar sağlaması, uygulanmasını ve daha da geliştirilmesini desteklemiştir. MALDI-TOF ile rutin olarak tanımlanabilen mikrobiyal türlerin sayısı son birkaç yılda artmıştır ve artık tüberküloz dışı mikobakterileri ve yakın ilişkili olan *Nocardia* türlerini güvenilir bir şekilde belirlemek mümkündür. Hem *Candida* hem de *Candida* dışı cinslere ait olan mayalar, filamentöz mantarlarla birlikte MALDI-TOF tarafından tanımlanabilir. Genelde, MALDI-TOF, tüberküloz dışı *Mycobacterium* türlerinin oldukça güvenilir bir şekilde tanımlanmasını sağlar. Bu tanımlamaların doğruluğu, moleküler yöntemlerle sağlananlarla karşılaştırılabilir ancak MALDI-TOF'un geri dönüş süresi, numunelerin 30 dakika boyunca ısı bloğunda etkisiz hale getirilmesi ihtiyacı nedeniyle yaklaşık 1 saattir. MALDI-TOF'un bu mikroorganizmaların tanımlanmasındaki bariz avantajlarına rağmen, birçok kullanıcı, numunelerin ön işlemlerinin olması onları tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlanması için rutin olarak MALDI-TOF uygulamaktan vazgeçirdiğini beyan etmektedir. Ancak son yıllarda bu konuda artan yayın sayısı, MALDI-TOF'un bu uygulamasının giderek yaygınlaştığını göstermektedir (38, 39).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarındaki klinik örneklerden 2016-2021 tarihlerinde izole edilmiş 65 adet TDM suşu retrospektif olarak çalışma kapsamına alınmıştır. İzole edilen suşlar Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında (Line Probe Assay (LIPA) yöntemi) GenoType Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) ve GenoType Mycobacterium AS (Additional Species), (Hain Lifescience, Almanya) kiti ile tanımlanmış, MALDI-TOF'un bu yönetime göre avantaj ve dezavantajlarının belirlenmesi planlanmıştır.

- **TDM'lerin pasajlanması**
- Mikrobanklarda -20°C de saklanmış olan 65 izolatdan 45 tanesi bulunmuş Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) besiyerine 2-3 boncuk ilavesi ile canlandırılmak üzere MGIT960 cihazına yüklenmiş ve takip edilmiştir. Pozitif sinyal veren 24 adet tüpten mikobakteri ekstraksiyonu işlemine geçilmiştir.
- **Mikobakteri Ekstraksiyonu (MycoEX) Yöntemi**
- Biyogüvenlik seviyesi 3 olarak çalışılması gerekmekte olup bu izolatlar öncelikle ısıyla inaktivasyona tabi tutulmuştur. Mikobakterilerin MALDI Biotyper numunesinin hazırlanması için Bruker Daltonik GmbH tarafından tavsiye edilen inaktivasyon ve ekstraksiyon prosedürü kullanılmıştır (40).

### **Gerekli Kimyasallar ve Aksesuarlar**

- Deiyonize su
- Etanol, mutlak (EtOH)

- Asetonitril (ACN)
- %70 [v/v] Formik asit (FA)
- Trifloroasetik asit (TFA)
- Matrix HCCA
- 50–1000 µL pipet uçları ve uygun bir pipet
- 2-200 µL pipet uçları ve uygun bir pipet
- 0,5–10 µL pipet uçları ve uygun bir pipet
- Eppendorf Tüpleri 1,5 mL
- Tek kullanımlık Pastör pipeti
- 0,5 mm Zirkonya / Silika boncuklar
- MALDI hedef pleyti

#### **Gerekli Laboratuvar Aletleri**

- Tezgah üstü santrifüj
- Vorteks
- Isı ile inaktivasyon için donatım (ısı blokları)

#### **$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) çözeltisi hazırlamak için**

- 250 µL porsiyonlara ayrılmış standart solvent bir Matrix HCCA tüpüne pipetlenir. Çözelti berraklaşana kadar oda sıcaklığında bir vorteks karıştırıcı kullanılarak HCCA çözülür.

#### **Sıvı besiyeri numuneleri**

- Biyokütlenin çoğu tüpün altında olmalı. Biyokütle süspansiyon halindeyse, tüpün dibine çökene kadar 5 ila 10 dakika beklenmiş. MGIT tüpünün dip kısmından 1,2 mL sıvı aspire ederek ve aspire edilen sıvıyı bir eppendorf tüpüne aktararak biyokütle toplanmıştır. Çok

az biyokütle görünüyorsa: Tüm MGIT kültürü uygun bir santrifüj tüpüne aktarılmış, kullanılan santrifüj tüpü için izin verilen maksimum hızda 15 dakika santrifüjlenmiştir. 1 mL hariç tüm süpernatant dikkatlice aspire edilir pellet kalan besiyeri yeniden süspanse edilir. Süspanسیون bir eppendorf tüpüne aktarılır ve protokole devam edilir. Maksimum hızda ( $\geq 13.000$  rpm) 2 dakika santrifüjlenmiş ve bir pipet kullanılarak süpernatant dikkatlice çıkarılmıştır. Pellete 300  $\mu$ L deiyonize su eklenmiş, 30 dakika kaynatılarak ısı ile inaktivasyon gerçekleştirilmiştir.

- Eppendorf tüpüne 900  $\mu$ L etanol pipetlenir ve bir vorteks karıştırıcı kullanarak karıştırılmış, maksimum hızda ( $\geq 13.000$  rpm) 2 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant boşaltılmıştır. Tekrar santrifüjlenmiş ve bir pipet kullanılarak kalan sıvı dikkatlice çıkarılmıştır. Pellet oda sıcaklığında kurutulmuştur. Eppendorf tüpüne küçük bir spatula ucu ile Zirkonya/Silika boncukları eklenmiştir. Pellet boyutuna bağlı olarak, eppendorf tüpüne 10–50  $\mu$ L saf asetonyril eklenmiştir. Bir vorteks karıştırıcı kullanılarak maksimum hızda 1 dakika karıştırılmış, asetonyril hacmine eşit hacimde %70 formik asit eklenmiş ve bir vorteks karıştırıcı kullanılarak 5 saniye karıştırılmıştır. 2 dakika maksimum hızda ( $\geq 13.000$  rpm) santrifüjlenmiştir. MALDI-TOF hedef pleytine 1  $\mu$ L süpernatant yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Numune kuyucuğu kuruduktan hemen sonra, kuyucuğa 1  $\mu$ L matriks eklenmiştir. Matriks kuruduktan sonra MALDI-TOF cihazında okutma gerçekleştirilerek kütüphanesinde eşleşen Mikobakteri türü ve MALDI-TOF skoru kaydedilmiştir. MBT Mycobacteria Library version 7.0 veritabanı kullanılmıştır.

Her izolat MALDI-TOF pleytinin 3 kuyucuğuna sürülmüş ve skoru en yüksek olan sonuçlar dikkate alınmıştır. İzolatlar skorlarına göre 4 farklı gruba ayrılmıştır: <1,6; 1,6-1,8 arasında olanlar, 1,8-2,0 arasında olanlar ve >2,0 olanlar. >1,6 skorlar güvenilir olarak kabul edilmiştir.

Hastalara ait cinsiyet örnek dağılımlarında kayıt edilmiştir. Çalışılan örnek sayısı yeteri kadar olmadığı için herhangi bir istatistiksel analiz yapılamamıştır.

### **Etik Kurul Onayı**

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 02 Mart 2022 tarih, 2022-5/3 nolu karar ile onaylanmıştır.



## BULGULAR

Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarındaki klinik örneklerden 2016-2021 tarihlerinde izole edilmiş 65 adet TDM suşu retrospektif olarak çalışma kapsamına alınmıştır. İzole edilen suşlar Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında (Line Probe Assay (LIPA) yöntemi) GenoType Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) ve GenoType Mycobacterium AS (Additional Species), (Hain Lifescience, Almanya) kiti ile tanımlanmıştır. MALDI-TOF'un bu yöntemle göre avantaj ve dezavantajlarının belirlenmesi planlanmıştır.

Mikrobanklarda -20°C de saklanmış olan 65 izolatdan 45 tanesi bulunmuş Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) besiyerine 2-3 boncuk ilavesi ile canlandırılmak üzere MGIT960 cihazına yüklenmiş ve takip edilmiştir. Pozitif sinyal veren 24 adet tüpten mikobakteri ekstraksiyonu işlemine geçilmiştir. Bunlardan 4 tanesi mikobakteri dışında farklı bakteri türleri olarak tanımlandığı için kontaminasyon olarak değerlendirilmiş ve çalışma dışı bırakılmıştır. Geriye kalan 20 tane izolat MALDI-TOF MS yöntemi ile yapılan tanımlama sonrasında referans laboratuvarından gelen sonuçlarla karşılaştırıldığında %100 uyumlu çıkmıştır.

GenoType CM/AS yöntemi ile *M. abscessus* complex olarak tanımlanan 3 izolat, *M. abscessus* ssp. *abscessus* olarak tanımlanan 1 izolat, *M. fortuitum* group olarak tanımlanan 4 izolat, *M. fortuitum* complex olarak tanımlanan 1 izolat, sırasıyla MALDI-TOF MS yöntemi ile *M. abscessus*, ve *M. fortuitum* olarak tanımlanmıştır. Bir izolat GenoType CM/AS kiti ile *M. fortuitum* group olarak sonuçlanmıştır. Bu izolat MALDI-TOF MS yöntemi ile *M. fortuitum* group üyesi olan *M. farcinogenes* olarak saptanmıştır (Tablo 2).

**Tablo 2:** MALDI-TOF MS ve GenoType CM/AS sonuçlarının karşılaştırılması.

<b>GenoType CM ve AS sonuçları</b>	<b>MALDI-TOF MS sonucu</b>	<b>MALDI-TOF MS Skoru</b>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	1,82
<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1,72
<i>M. abscessus</i> complex	<i>M. abscessus</i>	2,02
<i>M. abscessus</i> complex	<i>M. abscessus</i>	1,65
<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1,86
<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	1,61
<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	1,78
<i>M. abscessus</i> complex	<i>M. abscessus</i>	1,68
<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	1,61
<i>M. fortuitum</i> group	<i>M. fortuitum</i>	2,05
<i>M. fortuitum</i> group	<i>M. fortuitum</i>	2,06
<i>M. fortuitum</i> group	<i>M. fortuitum</i>	2,09
<i>M. fortuitum</i> group	<i>M. fortuitum</i>	2,20
<i>M. abscessus</i> ssp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1,56
<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	1,74
<i>M. fortuitum</i> complex	<i>M. fortuitum</i>	2,23
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	2,37
<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1,68
<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	1,77
<i>M. fortuitum</i> group	<i>M. farcinogenes</i>	1,51

Her izolat MALDI-TOF pleytinin 3 kuyucuğuna sürülmüş ve skoru en yüksek olan sonuçlar dikkate alınmıştır. İzolatlar skorlarına göre 4 farklı gruba ayrılmıştır: <1,6; 1,6-1,8 arasında olanlar, 1,8-2,0 arasında olanlar ve >2,0 olanlar. >1,6 skorlar güvenilir olarak kabul edilmiştir. 20 izolatdan ikisi <1,6 (%10), dokuzu 1,6-1,8 (%45) arasında, ikisi 1,8-2,0 (%10) arasında, yedisi >2,0 (%35) olmuştur (Tablo 3).

İzolatların tür dağılımı *M. abscessus* (8) %40, *M. fortuitum* (6) %30, *M. chelonae* (5) %25, *M. farcinogenes* (1) %5 olmuştur.

**Tablo 3:** MALDI-TOF skorlarına göre mikobakteri türleri ve yüzdeleri.

Mikobakteri türü	Yüzde dağılımı	MALDI-TOF skoru <1,6	MALDI-TOF skoru 1,6-1,8	MALDI-TOF skoru 1,8-2,0	MALDI-TOF skoru >2,0
<i>M. abscessus</i> 8	%40	1	5	1	1
<i>M. fortuitum</i> 6	%30				6
<i>M. chelonae</i> 5	%25		4	1	
<i>M. farcinogenes</i> 1	%5	1			
Toplam 20		2 (%10)	9 (%45)	2 (%10)	7 (%35)

Çalışma kapsamında kullanılan suşların altısı (%30) kadın, on dördü erkek hastalara (%70) ait olup, 1 hastanın 3 örneği olmakla toplam 18 hastadan 20 örnek kullanılmıştır. Örneklerin dağılımı ise; altı (%30) balgam, beş (%25) bronş lavajı, dört (%20) bronkoalveoler lavaj (BAL), iki (%10) açlık mide suyu (AMS), bir (%5) idrar, bir (%5) plevra sıvısı ve bir (%5) beyin omurilik sıvısı (BOS) şeklindedir. Laboratuvara gönderilen klinik örneklerin dağılımı Tablo 4'de gösterilmiştir.

**Tablo 4:** Laboratuvara gönderilen klinik örneklerin dağılımı

<b>Klinik örnek türü</b>	<b>Örnek sayısı</b>
Balgam	6
Bronş lavajı	5
BAL	4
MAS	2
İdrar	1
BOS	1
Plevral sıvı	1
Toplam	20

Örneklerin laboratuvarımızda pozitiflik saptanıp TDM olarak kliniğe bildirimini takiben ortalama 31 gün sonra klinikten TDM üremesinin tür düzeyinde tanımlanması için Referans Laboratuvarına gönderilmesi talep edilmiştir. Çalışmamızda olan örneklerin referans laboratuvarında tanımlanma süresi Tablo 5’de gösterilmiştir. Bu süre MALDI-TOF ile tanımlama yapıldığında örneğin pozitifliğinden en geç 1 gün sonra gibi oldukça kısa bir süredir.

**Tablo 5:** Örneklerin referans laboratuvarında tanımlanma süresi

Örnek no	Referans laboratuvardan sonuçlanma zamanı (Gün)
1	15
2	23
3	18
4	30
5	27
6	6
7	16
8	73
9	29
10	41
11	84
12	31
13	57
14	46
15	15
16	52
17	95
18	15
19	20
20	49
Ortalama	37,1

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikobakterilerin incelenmesine yönelik moleküler yöntemler, türlerin tanımlanmasında büyük ilerleme sağlamış ve yeni türlerin tanımlanmasına olanak sunmuştur. Ancak moleküler tanı teknikleri, maliyetleri ve karmaşıklıkları nedeniyle tüm laboratuvarlarda mevcut değildir. Çoğu laboratuvarında ticari hibridizasyon yöntemleri mevcut olsa da, 150'den fazla bilinen TDM türü olmasına rağmen, farklı TDM türlerini tanımlama kapasiteleri sınırlıdır. Mikobakterilerin etken olduğu enfeksiyonlar, özellikle çocukları, bağışıklığı baskılanmış kişileri ve kistik fibroz gibi diğer patolojileri olan hastaları etkilerken, TDM'nin neden olduğu enfeksiyonlar hala büyük bir sorundur. MALDI-TOF, özellikle basitliği ve veri tabanında yer alan 182 mikobakteri türü göz önüne alındığında, laboratuvarlara mikobakterilerin tanımlanması için yeni bir teknik olabilir (41). Son yıllarda artan TDM enfeksiyonları ve uygun antimikrobiyal tedavi için tür düzeyinde tanımlama gerekmektedir.

Costa-Alcalde ve ark. (42) yaptıkları çalışmada GenoType CM/AS (Hain, Lifescience, Almanya), MALDI-TOF MS (Bruker) ve referans yöntemi olarak kısmi *rpoB* gen dizilimi kullanmışlar. GenoType ve MALDI-TOF MS ile referans yöntem olan kısmi *rpoB* gen dizileme arasındaki uyum sırasıyla 27/43 (%62,8) ve 38/43 (%88,3) olmuştur. GenoType CM/AS kiti ile doğru şekilde tanımlanan tüm izolatlar, MALDI-TOF MS (27/27) yöntemi ile de aynı sonuçlanmıştır. Ancak MALDI-TOF MS, GenoType kiti ile yanlış tanımlanan izolatların %68,75'ini (11/16) doğru olarak tanımlamıştır.

Rindi ve ark. (43) toplam 60 pozitif MGIT sıvı besiyeri, Bruker Biotyper sistemi ile Mycobacteria Library v. 2.0 (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG. Bremen, Almanya) ile incelemiş, sonuçları, GenoType Mycobacterium CM/AS/NTM-DR ile elde edilenlerle karşılaştırmışlar. Tüm numuneler, MALDI-TOF MS ve test edilen tüm mikobakteriler için moleküler test ile uyumlu bir şekilde tanımlanmıştır. Klinik numunelerden elde edilen TDM için elli yedi (%95) MGIT pozitif kültürün MALDI-TOF MS analiz skoru  $\geq 1,8$  olmuştur. Az sayıda suş ve sınırlı çeşitlilikte mikobakteriyel tür analiz

edilmiş olsa da, sonuçlar MALDI-TOF MS'nin mikobakteriyel türleri doğrudan birincil sıvı kültürden tanımlamak için umut verici bir rutin tanı yöntemi olarak göstermiştir.

İspanya'dan bir çalışmada, Mediavilla-Gradolph ve ark. (41) toplamda 66 TDM örneği kullanmış ve bu örneklerin 65'inde (%98,5) skorun >1,6 ile >2,0 arasında tanımlandığını ve bir örneğin (%1,5) ise tanımlanamadığını (*M. duvalii*) bildirmişlerdir. Esas olarak solunum yolu örneği olmakla birlikte farklı tipte klinik örneklerden toplam 66 izolat (66 hastadan) analiz edilmiş. Burada klinik örneklerden TDM'nin tanımlanması için MALDI-TOF ve GenoType Mycobacterium CM/AS sonuçlarını karşılaştırmışlar. Çalışılan 66 TDM'nin 65'inde MALDI-TOF ve 64'ünde GenoType ile sonuç almışlar. MALDI-TOF MS, 65 (% 98,5) izolat için kabul edilebilir güvenli skorlar oluşturmuş ve yöntemin mikobakteri türlerinin tanımlanması için doğru, hızlı ve uygun maliyetli olduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda da 2 yöntem arasındaki uyum bu çalışmaya yakın olmuştur. İki çalışma arasındaki en önemli fark kullanılan besiyerleridir. MALDI-TOF MS ile tanımlama çalışmamızda MGIT besiyerinden bu çalışmada Lowenstein-Jensen besiyerinden yapılmıştır.

Genç ve ark. (44) bu çalışmada; retrospektif olarak klinik örneklerden izole edilmiş ve TDM olduğu belirlenen suşların tanımlanması MALDI-TOF MS, GenoType Mycobacterium CM/AS ve altın standart olarak kabul edilen hsp65-PRA yöntemleri ile yapılmıştır. MALDI-TOF MS yöntemi ve hsp65-PRA ile tanımlama sonuçları karşılaştırıldıklarında; 92 suşun (%92; 92/100) sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğu, sekiz suşun (%8; 8/100) altısının MALDI-TOF MS yöntemi ile farklı tanımlandığı, birinin TDM olarak, birinin ise tanımlanamadığı saptanmıştır.

Rodriguez-Sanchez ve ark. (45), yaptığı çalışmada, 125 TDM izolatının tanımlanması için MALDI-TOF MS ve GenoType CM/AS yöntemlerini karşılaştırmışlar. Referans yöntem olarak 16S rRNA/hsp65 dizilimi ile tanımlama kullanılmıştır. Referans yöntemle MALDI-TOF ve GenoType CM/AS arasındaki uyum sırasıyla %94,4 ve %84,0 olmuştur. 17 vakada (%13,6), GenoType ve MALDI-TOF tarafından sağlanan sonuçlar

uyumsuz olmuş; ancak, referans yöntemi 16/17 vakada MALDI-TOF ile uyumlu sonuçlanmıştır.

Bizim çalışmamızda GenoType ve MALDI-TOF yöntemleri arasındaki uyum 20/20 (%100) olmuştur.

Marekovic ve ark. (46) Zagreb Üniversite Hastanesinde 25 adet TDM izolatı ile yaptıkları çalışmada MALDI-TOF %80'ini (20/25) doğru tanımlamıştır. Güvenilir MALDI-TOF MS tanımlaması olmayan beş izolat, *Mycobacterium avium-intracellulare* kompleksine ait olmuştur. MALDI-TOF MS ile başarılı bir şekilde tanımlanan TDM izolatlarının yüzde yetmişi (14/20) 2,0'dan yüksek bir skora sahip olmuştur.

Bizim çalışmamızda 20 adet TDM izolatından MALDI-TOF %100'ünü doğru tanımlamıştır. Bunlardan 7 izolat (%35) >2,0 skorla tanımlanmıştır.

Toney ve ark. (47) Bruker Biotyper matris yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) platformu, ile 314 tüberküloz dışı mikobakteriyi (TDM) doğru bir şekilde tanımlama yeteneği açısından değerlendirmişler. TDM izolatlarının protein ekstraksiyonu için Bruker boncuk atma prosedürünün optimize edilmiş bir versiyonu, daha az sıklıkla karşılaşılan türler de dahil olmak üzere tüm TDM izolatları için yüksek kaliteli spektrum sağlamak amacıyla kullanılmıştır. TDM spektrumları, Bruker'in yalnızca araştırma amaçlı kullanımı olan Mycobacteria Library v6.0 ve MicrobeNet veri tabanı ile desteklenerek analiz edilmiştir. MALDI-TOF tarafından TDM tanımlamasının doğruluğu %94 (296/314) olmuştur. Hızlı üreyen mikobakteriler için tanımlama doğruluğu %99 (182/183) ile yavaş üreyen mikobakteriler için olan %87'den (114/131) daha yüksek olmuştur. Genel olarak, bu çalışmanın sonuçları, TDM'nin tanımlanması için doğru ve güvenilir bir yöntem olarak Bruker'in MALDI-TOF platformunu desteklemiştir.

Bu çalışmayla bizim çalışmamızı karşılaştırdıkta izolat sayılarında büyük fark olmasına rağmen hızlı büyüyen mikobakteriler için tanımlama doğruluğu uyumlu olmuştur. Çalışmamızda %100 bu çalışmada %99 doğru tanımlanmıştır.

Pastrone ve ark. (48) 7H11 agar ve MGIT besiyerlerinde üretilen elli TDM izolatını çalışmaya dahil etmişler. LPA sonuçlarını referans olarak



kullanarak TDM tanımlaması için yeni tanıtılan MBT Mikobakteri kitini (MBT) ve MycoEx hazırlama protokolünü (Bruker Daltonics, Almanya) değerlendirmişler. Bruker MicroFlex® LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) kullanılarak her iki protokol ile analiz edilmiştir. MBT ve MyCoex, vakaların sırasıyla %97,0 ve %95,0'de tanımlama sonuçları sağlamıştır. Her iki protokolde, sağlanan sonuçlar %100 LPA ile uyumlu olmuştur. Sonuçlar, MALDI-TOF MS'in hasta sonucu için potansiyel etkileri ile zamanında ve maliyet tasarrufu sağlayan TDM tanımlaması için büyük bir avantaj sağlayabileceğini düşündürmüştür.

Rodriguez-Temporal ve ark. (49) sıvı besiyerinden toplam 693 klinik izolat ve katı besiyerinden 760 klinik izolatu analiz etmiş ve 67 farklı tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) türü çalışmaya dahil etmiştir. MALDI-TOF MS ile sıvı besiyerinden 558 (%80,5) izolat ve katı besiyerinden 712 (%93,7) izolat tanımlanmış ve skoru  $\geq 1,60$  olmuştur. Bunlar arasında sıvı besiyerinden dört (%0,7) ve katı besiyerinden dört (%0,5) izolat yanlış tanımlanmıştır. Tür çeşitliliği ile ilgili olarak, MALDI-TOF MS 64 (%95,5) farklı türü başarıyla tanımlarken, PCR-ters hibridizasyon (GenoType Mycobacterium CM ve AS kiti) 24 (%35,8) farklı tür tanımlamıştır.  $\geq 2,0$  MALDI-TOF MS skoru ile tüm izolatlarda doğru şekilde tanımlanmış. 1,60 ila 1,99 aralığındaki skorlarla, *Mycobacterium angelicum*, *M. parascrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. porcinum* ve *M. gastri*, dışında çoğu izolat doğru şekilde tanımlanmıştır. Sonuç olarak, MALDI-TOF MS'in, çok çeşitli TDM türlerinin tanımlanması için yararlı bir yöntem olduğu düşünülmüştür. 1,60'lık bir puan değeri, test edilen izolatlarda neredeyse tamamının tanımlanması için faydalı olmuş; sadece birkaç tür, geçerli bir kesin tanımlama elde etmek için daha yüksek bir puan ( $\geq 2,0$ ) gerektirmiştir.

Bizim çalışmamızda  $\geq 1,60$  tanımlanan izolat sayısı 18 (%90) olmuştur.

Kodana ve ark. (50) yaptıkları çalışmada 75 adet klinik TDM izolatu PZR, DNA-DNA hibridizasyon (DDH) ve MALDI-TOF MS yöntemleri kullanarak analiz etmiş ve MALDI-TOF MS yönteminin sonuçları diğerleriyle karşılaştırılmıştır. Yetmiş beş izolattan 71'inde (%94,5) tür düzeyinde

tanımlama uyumlu olmuştur. Mevcut bulgular, nadir bakteri türleri için tanımlamanın bazen mümkün olmadığını, ancak çoğu durumda MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlama sonuçlarının PZR ve DDH yöntemlerinin sonuçlarıyla yüksek bir uyum oranına sahip olduğunu göstermektedir.

Rodríguez-Sánchez ve ark. (51) matris yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu-uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS), Mycobacteria Library v2.0 kullanarak tüberküloz dışı mikobakterileri hızlı bir şekilde belirleme yeteneğini göstermiştir. Bununla birlikte, bazı türlerin bu veri tabanını kullanarak güvenilir bir şekilde tanımlanması özellikle zordur ve düşük skor sağlar. Bu çalışmada, güncellenmiş Mycobacteria Library (v3.0) tanımlama gücü değerlendirilmiştir. Genel olarak, 109 NTM izolatı her iki veritabanıyla analiz edilmiş. Yüksek güvenilirlikli  $\geq 1,8$  tanımlama Mycobacteria Library (v3.0) ile %91,7, Mycobacteria Library v2.0 ile %83,5 olmuştur.

Bizim çalışmamızda da 9 tane izolat (%45) yüksek güvenilirlikli  $\geq 1,8$  olarak tanımlanmıştır.

Sonuç olarak, MALDI-TOF MS yönteminin TDM'lerin doğru, hızlı, ucuz ve kolay olarak tanımlanmasında etkili bir teknik olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bu yöntem, bakteri kontaminasyonu veya birden fazla mikobakteri türünün varlığında ya da veritabanının kısıtlı olması durumunda yetersiz kalabilmektedir. Sonuçların klinik uygulamalarla validasyonunun sağlanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu düşünülmüştür. Çalışmamızda planlanan izolat sayısına ulaşamayarak 20 izolat üzerinden çalışmayı sonuçlandırmamız elde edilen sonuçların gücünü azaltıcı bir faktör olmuştur.

## KAYNAKLAR

1. Van Ingen J. Diagnosis of nontuberculosis mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34: 103-9.
2. Sürücüoğlu S. Tüberküloz Dışı Mikobakteri İnfeksiyonları: Neredeyiz? Yeni tanı yöntemleri ve sorunları. In: Akhan S (ed). 15. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı. 2011. 166-8.
3. Al-Houqani M, Jamieson F, Mehta M, et al. Aging, COPD and other risk factors do not explain the increased prevalence of pulmonary Mycobacterium avium complex in Ontario. *Chest* 2012; 141:190-97.
4. Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *J Microbiol Methods* 2008; 75: 1-11.
5. Riley RL, Mills CC, O'Grady F, et al. Infectiousness of air from a tuberculosis ward-ultraviolet irradiation of infected air: comparative infectiousness of different patients. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85:511-25.
6. CDC History of World TB day <https://www.cdc.gov/tb/worldtbdays/history>. (Erişim: 11.12.2022).
7. Barış Yİ. Dünya'da Tüberkülozun Tarihçesi. *Toraks Dergisi*. 2002;3(3): 338-34.
8. Hayman J. Mycobacterium ulcerans: an infection from Jurassic time? *Lancet* 1984;2:1015–6.
9. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog* 2005;1:e5.
10. Kapur V, Whittam TS, Musser JM. Is Mycobacterium tuberculosis 15,000 years old? *J Infect Dis* 1994;170:1348–9.
11. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:3684–9.
12. Gagneux S, DeReimer K, Tran V, et al. Variable host–pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2869–73.

13. Hirsh AE, Tsolaki AG, DeReimer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4871–6.
14. Gordin FM, Horsburgh CR Jr. *Mycobacterium avium* complex. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Eighth ed. Philadelphia: Elsevier, 2015: 2832-43.
15. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Infections caused by nontuberculous mycobacteria other than *Mycobacterium avium* complex, In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Eighth ed. Philadelphia: Elsevier, 2015: 2844-52.
16. Fordham von Reyn C: Nontuberculous mycobacteria. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, USA; 2005: 972-76.
17. Yüce A, Yapar N. Tüberküloz dışı mikobakteriler. Serter D, Ertem E, Gökengin D (eds). *Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları*. İzmir: Nobel Tıp Kitabevi; 2000. 382-89.
18. Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology* Washington, DC: ASM Press, 2007: 543-72.
19. Koch, R. Die Aetiologie der Tuberkulose. *Berl Klin Wochenschr* 1882; 19: 221-30.
20. Ziehl-Neelsen boyası. [https://tr.wikipedia.org/wiki/Ziehl-Neelsen\\_ boyası](https://tr.wikipedia.org/wiki/Ziehl-Neelsen_boyası) (Erişim: 14.03.2023).
21. Mahapatra S, Basu J, Brennan PJ, Crick DC. Structure, biosynthesis, and genetics of the mycolic acid-arabinogalactan-peptidoglycan complex. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR. Jr (eds). *Tuberculosis and Tubercle Bacillus*, Washington, DC: ASM Press, 2005: 275.
22. Draper P, Daffe M. The cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* with special reference capsule and outer permeability barrier. In: Cole ST,

- Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR. Jr (eds). Tuberculosis and Tubercle Bacillus. Washington, DC: ASM Press, 2005: 261.
23. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. Clin Microbiol Rev 2003: 463-96.
24. Chan J, Kaufmann HE. Immune Mechanisms of Protection. In: Bloom BR (ed). Tuberculosis, pathogenesis, protection and control. Washington DC: ASM Press, 1994: 389-416.
25. Mikobakteri hücre duvarı. <https://doktorumnedio.com/temel-tip/arb-boyama-nedir-ne-amacla-yapilir/> (Erişim: 14.03.2023).
26. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 935, Ankara, 2014.
27. Yeboah-Manu D, Bodmer T, Mensah-Quainoo E, et al. 2004. Evaluation of decontamination methods and growth media for primary isolation of *Mycobacterium ulcerans* from surgical specimens. J Clin Microbiol 42:5875–6.
28. Yeboah-Manu D, Danso E, Ampah K, et al. 2011. Isolation of *Mycobacterium ulcerans* from swab and fine-needle-aspiration specimens. J Clin Microbiol 49:1997–1999.
29. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, et al. 1997. Comparison of the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. J Clin Microbiol 35:364–8.
30. Hall L, Roberts GD. Non-molecular identification of nontuberculosis mycobacteria in the clinical microbiology laboratory: What's the real deal? Clin Microbiol Newsletter 2006; 28: 73-80.
31. Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Diseases in Immunocompetent Patients. Korean J Radiol 2002;3(3):145-57.
32. Patricia JS, Stenger S, Richter E, et al. *Mycobacterium*: Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria. In: Jorgensen JH, Paller MA, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology 11 th ed. ASM Press: Washington DC; 2015. 570-94.

33. Richter E, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. *Mycobacterium*: Laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (ed). Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press, 2011: 503-24.
34. Russo C, Tortoli E, Menichella D. Evaluation of the new GenoType *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species. J Clin Microbiol 2006; 44: 334-9.
35. Tortoli E, Pecorari M, Fabio G, Messino M, Fabio A. Commercial DNA probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species. J Clin Microbiol 2010; 48: 307-10.
36. Slany M, Pavlik I. Molecular detection of nontuberculous mycobacteria: Advantages and limits of a broad range sequencing approach. J Mol Microbiol Biotechnol 2012; 22: 268-76.
37. Heller LC, Jones M, Widen RH. 2008. Comparison of DNA pyrosequencing with alternative methods for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 46:2092–4.
38. M. Oviano, B. Rodríguez-Sánchez MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2021;39(4):192–200.
39. Grenga L, Pible O, Armengaud J. Pathogen proteotyping: A rapidly developing application of mass spectrometry to address clinical concerns. Clinical Mass Spectrometry 14 (2019) 9–17.
40. Bruker Daltonics, Inc. (2014) Standard Operating Procedure: Mycobacteria extraction(MycoEX) method (version 3). Bruker Daltonics, Bremen.
41. Mediavilla-Gradolph MC, Toro-Peinado ID, Bermúdez-Ruiz MP et al. Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens. BioMed Research International 2015; 1-6.
42. Costa-Alcalde JJ, Barbeito-Castineiras G, González-Alba JM et al. Comparative evaluation of the identification of rapidly growing non-tuberculous mycobacteria by mass spectrometry (MALDI-TOF MS),

GenoType Mycobacterium CM/AS assay and partial sequencing of the *rpoB* gene with phylogenetic analysis as a reference method. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37(3):160–166.

43. Rindi L, Puglisi V, Franconi I, Fais R, Lupetti A. Rapid and Accurate Identification of Nontuberculous Mycobacteria Directly from Positive Primary MGIT Cultures by MALDI-TOF MS. *Microorganisms* 2022; 10: 1447.

44. Genc GE, Demir M, Yaman G ve ark. Evaluation of MALDI-TOF MS for identification of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens in mycobacteria growth indicator tube medium. *New Microbiologica* 2018; 41 (3): 214-9.

45. Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Marín M, et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nontuberculous Mycobacteria from Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2015;8:2737-41.

46. Marekovic I, Boinjak Z, Jakopovic M, et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *Chemotherapy* 2016; 4: 167–170.

47. Toney NC, Zhu W, Jensen B et al. Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library for Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2022;60:1-9.

48. Pastrone L, Curtoni A, Criscione G et al. Evaluation of Two Different Preparation Protocols for MALDI-TOF MS Nontuberculous Mycobacteria Identification from Liquid and Solid Media. *Microorganisms* 2023;11:1-9.

49. Rodriguez-Temporal D, RodríguezSánchez B, Alcaide F. Evaluation of MALDI Biotyper interpretation criteria for accurate identification of nontuberculous mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2020; 58:e01103-20.


50. Kodana M, Tarumoto N, Kawamura T, et al. Utility of the MALDI-TOF MS method to identify nontuberculous mycobacteria. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2016;1:32-5.

51. Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, et al. 2016. Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v3.0 for identification of nontuberculous mycobacteria. *J Clin Microbiol* 54:1144-7.



## EKLER

### EK-1: Araştırma İzinleri



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 2011-KAEK-26/186  
Konu : Etik kurul kararı

04 / 03 / 2022

Sayın Prof.Dr.Cüneyt ÖZAKIN  
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Kurulumuza başvurusunu yaptığımız ve sorumlu araştırmacısı olduğunuz "Tüberküloz dışı mikobakterilerin "MALDI-TOF MS" yöntemi ile tanımlanması" başlıklı araştırmanız ile ilgili kurulumuzun 02 Mart 2022 tarih, 2022-5/13 nolu kararı ekte gönderilmektedir.

Araştırmanın tamamlanma bildiriminin ve özet sonuç raporunun kurulumuza iletilmesi için bilgilerinize sunulur.

Prof.Dr.Mustafa HAK MUSTAFAOĞLU  
Kurul Başkanı

EK:  
-Karar (1 adet)

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası, Görükle Kampüsü 16059 Nilüfer/BURSA  
Tel: 0-224-2950020 Fax: 0-224-2950029  
e-posta: [uukaek@uludag.edu.tr](mailto:uukaek@uludag.edu.tr) Elektronik Ağ: [www.tip.uludag.edu.tr](http://www.tip.uludag.edu.tr)

**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

<b>ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI</b>	Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin "MALDI-TOF MS" Yöntemi İle Tanımlanması
------------------------------	--

<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>	<b>ETİK KURULUN ADI</b>	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-26
	<b>AÇIK ADRESİ</b>	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası Kat.1 Görükle Kampüsü Nilüfer/ Bursa
	<b>TELEFON</b>	0.224. 295 00 20
	<b>FAKS</b>	0.224. 295 00 29
	<b>E-POSTA</b>	uukaek@uludag.edu.tr

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	<b>SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI</b>	Prof.Dr.Cüneyt Özakın
	<b>SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ</b>	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
	<b>YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI</b>	Araş.Gör.Dr.Vugar Huseynov
	<b>YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ</b>	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
	<b>DESTEKLEYİCİ</b>	-
	<b>ARAŞTIRMANIN TÜRÜ</b>	Retrospektif araştırma
	<b>ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI</b>	Uzmanlık tez çalışması
	<b>ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ</b>	01.05.2022 / 9 ay
	<b>GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI</b>	65 suş örneği
	<b>ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER</b>	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/> ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

<b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>	<b>Belge Adı</b>			<b>Tarihi</b>	<b>Diği</b>
		GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU			14.02.2022

<b>DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER</b>	<b>Belge Adı</b>		<b>Açıklama</b>
	<input checked="" type="checkbox"/>	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU	Tarih:14.02.2022
	<input checked="" type="checkbox"/>	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	Tarih:14.02.2022
	<input type="checkbox"/>	PROSPEKTİF ÖZELLİKLİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ	
	<input type="checkbox"/>	IKU klavuzunun okunduğuna dair taahhütname	
	<input type="checkbox"/>	SONUÇ ÖZET RAPORU	
	<b>DİĞER:</b>	<input checked="" type="checkbox"/>	Araştırma ilk başvuru ön yazısı (Tarih:14.02.2022), sorumlu araştırmacı özgeçmiş, tüm araştırmacılar tarafından imzalanmış Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi, literatür

**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

<b>ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI</b>	<b>Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin "MALDI-TOF MS" Yöntemi İle Tanımlanması</b>
------------------------------	---

<b>Karar No: 2022-5/13</b>	<b>Tarih: 02 Mart 2022</b>
----------------------------	----------------------------

<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelendi.
	1-Araştırmanın başvurusu dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna, 2-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesine, 3-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırmacılara iletilmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	<b>İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu</b>
----------------------	--

<b>BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI</b>	<b>Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU</b>
-----------------------------------	--

**ÜYELER**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof.Dr.Elif BAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof.Dr.M.Sertaç YILMAZ Üye	Farmakoloji	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Yenidoğan BD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç.Dr.Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	Bursa UÜ. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç.Dr.Özen ÖZ GÜL Üye	İç Hastalıklar Endokr.ve Metab.	BUÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıklar AD Endokrinoloji ve Metabolizma BD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Biyofizik AD	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi, Tıp Tarihi ve Etik AD.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Av. Ahmet BAYRAM	Hukuk	Bursa UÜ. Rektörlüğü Hukuk Bürosu	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Tolga MUHTAR Üye	Sağlık mesleği mensubu olmayan üye	Serbest Meslek	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>

\*:Toplantıda Bulunma

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Beyza Ener, Prof. Dr. Harun Ağca, Doç Dr. A. Melda Payaslıoğlu, Doç. Dr. Oktay Alver, Doç. Dr. İmran Sağlık, Doç. Dr. N. Ülkü Tüzemen'e, İmmünoloji Anabilim Dalı ve Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocalarıma,

Tezimin her aşamasında bana destek olan tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Cüneyt Özakın'a,

Arkadaşım Uz. Dr. Muhammet Çadır Yıldız ve Anabilim Dalımızda beraber çalıştığım çok değerli asistan arkadaşlarıma,

Laboratuvar pratiği kazanmamdaki katkılarından dolayı Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında görevli tüm biyolog ve teknikerlere,

Her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Nahçıvan'da 02.02.1985 tarihinde doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi Nahçıvan'da tamamladıktan sonra 2002 yılında Azerbaycan Tıp Üniversitesinde başladığım tıp eğitimimi 2008 senesinde tamamladım. 2019 yılına kadar pratisyen doktorluk yaptım. 2019 senesinde Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimine başladım. Evli ve iki çocuk babasıyım.