

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MYCOBACTERIUM KANSASII İZOLATLARINDA İLAÇ
DİRENÇ PROFİLİ VE İLGİLİ GEN MUTASYONLARI

Uzm. Bio. Hakan Farzin MEHMETZADE

Mikrobiyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2025

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***MYCOBACTERIUM KANSASII* İZOLATLARINDA İLAÇ
DİRENÇ PROFİLİ VE İLGİLİ GEN MUTASYONLARI**

Uzm. Bio. Hakan Farzin MEHMETZADE

**Mikrobiyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Alpaslan ALP**

**ANKARA
2025**

**MYCOBACTERIUM KANSASII İZOLATLARINDA İLAÇ DİRENÇ PROFİLİ VE İLGİLİ GEN
MUTASYONLARI**

Uzm. Bio. Hakan Farzin MEHMETZADE

Danışman: Prof. Dr. Alpaslan ALP

Bu tez çalışması 21/07/2025 tarihinde jürimiz tarafından "Mikrobiyoloji Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof. Dr. Teoman Murat ÖZSAN</i> (Ankara Üniversitesi)	(imza)
Üye:	<i>Prof. Dr. Zeynep SARIBAŞ</i> (Hacettepe Üniversitesi)	(imza)
Üye:	<i>Prof. Dr. Ebru US</i> (Ankara Üniversitesi)	(imza)
Üye:	<i>Prof. Dr. Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ</i> (Hacettepe Üniversitesi)	(imza)
Üye:	<i>Prof. Dr. Gülşen HAZIROLAN</i> (Hacettepe Üniversitesi)	(imza)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

104 Ağustos 2025

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

21 /07/2025

(İmza)

Uzm. Bio. Hakan Farzin Mehmetzade

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Alpaslan ALP danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Bio. Hakan Farzin Mehmetzade

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her daim yol gösteren, sabrı, bilgisi ve desteğiyle akademik gelişimime katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alpaslan Alp'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden Prof. Dr. Zeynep Sarıbaş ve değerli bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Doktora sürecindeki yoğun çalışmalarım sırasında bana büyük destek olan, sevgi ve anlayışıyla yanımda olan sevgili eşim Reyhan'a ve neşesiyle hayatıma anlam katan biricik çocuğum Ediz'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu süreçte her zaman yanımda olup manevi ve maddi güçlerini hissettiren kıymetli annem Safiye ve babam Nader'e minnettarım.

Hayatımda her zaman özel bir yeri olan, manevi desteğiyle bana güç veren sevgili manevi babam Mehmet Müştak'a, ayrıca Uzm. Dr. Davut Celali'ye içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı sorumlusu Dr. Bio. Süleyman Yalçın'a destek ve katkılarından dolayı ve istatistiksel hesaplamalarda, desteğiyle büyük katkıda bulunan Uzm. Dr. Baki Can Metin'e de teşekkürlerimi sunarım.

Uzm. Bio. Hakan Farzin MEHMETZADE

ÖZET

Mehmetzade, H.F., *Mycobacterium kansasii* izolatlarında ilaç direnç profili ve ilgili gen mutasyonları. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2025. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM), çoğunlukla çevrede bulunan bakterilerdir ve üreme hızlarına göre iki gruba ayrılırlar: Yavaş üreyen TDM ve hızlı üreyen TDM. *M. kansasii* yavaş üreyen bir mikobakteridir ve tüberküloza benzer akciğer hastalığı ve lenfadenit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi akciğer dışı hastalıklara neden olur. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de izole edilmiş olan 40 *M. kansasii* izolatının minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesi ve dirençli *M. kansasii* izolatlarında ilaç direncinden sorumlu *gyrA*, *gyrB*, *rpoB*, *rbpA* ve *rml* genlerinde mutasyon varlığının araştırılmasıdır. Bu çalışma beş aşamadan oluşmaktadır: Konvansiyonel ilaç duyarlılık testleri, DNA ekstraksiyonu, *gyrA*, *gyrB*, *rpoB*, *rbpA* ve *rml* genlerinin amplifikasyonu, Sanger DNA dizilemesi ve Nanopore dizileme. Çalışma sonucunda tüm izolatların amikasin (AMK), klaritromisin (CLA), linezolid (LZD), moksifloksasin (MXF) ve rifabutine (RFB) duyarlı olduğu; izolatların %90'ının siprofloksasin (SIP) ve rifampin (RIF), %47,5'inin doksisilin ve %70'inin trimetoprim/sülfametoksazole (TMP-SMZ) dirençli olduğu gösterilmiştir. Sensititre SLOMYCO panelinde minosiklin bulunmadığı için minosiklinin duyarlılık testi yapılamamıştır. Sanger dizileme sonucunda *gyrA*, *gyrB* ve *rml* genlerinde herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir. Rifampin Direnç Belirleyici Bölgesi'nde (Rifampin Resistance-Determining Region; RRDR) en sık görülen mutasyonların 447 ve 457 kodonlarında olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada ilk kez *rpoB* geninde RRDR dışındaki 226, 617, 1191 ve 2555. nükleotitlerde mutasyonlar tespit edilmiştir. Ayrıca, *rbpA* gen bölgesinde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Bu çalışma sonucunda rifampin dirençli izolatlarda *rpoB* geninde hem RRDR bölgesinde hem de RRDR dışında yeni mutasyonlar tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *M. kansasii*, ilaç direnci, mutasyon, Sanger dizileme, Nanopore dizileme.

ABSTRACT

Mehmetzade, H.F., Drug Resistance Profiles and Associated Gene Mutations in *Mycobacterium kansasii* Isolates. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, PhD Thesis in Microbiology, Ankara, 2025. Nontuberculous mycobacteria (NTM) are predominantly environmental bacteria that are categorized into two groups based on their growth rates: slow-growing and rapid-growing NTM. *M. kansasii* is a slow-growing mycobacterium responsible for tuberculosis-like pulmonary diseases as well as extrapulmonary conditions such as lymphadenitis, skin, and soft tissue infections. This study aimed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) values of 40 *M. kansasii* isolates that were isolated in Turkey and to investigate mutations in the *gyrA*, *gyrB*, *rpoB*, *rbpA*, and *rrl* genes that are associated with drug resistance in resistant isolates. The study was conducted in five stages: conventional drug susceptibility testing, DNA extraction, amplification of *gyrA*, *gyrB*, *rpoB*, *rbpA*, and *rrl* genes, Sanger DNA sequencing, and next-generation sequencing. As a result of the study, all isolates were found to be susceptible to amikacin (AMK), clarithromycin (CLA), linezolid (LZD), moxifloxacin (MXF), and rifabutin (RFB); while 90% of the isolates were resistant to ciprofloxacin (CIP) and rifampin (RIF), 47.5% were resistant to doxycycline, and 70% were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-SMZ). Susceptibility testing for minocycline could not be performed because minocycline is not included in the Sensititre SLOMYCO panel. Sanger sequencing revealed no mutations in the *gyrA*, *gyrB*, or *rrl* genes. The most frequent mutations in the Rifampin Resistance-Determining Region (RRDR) of the *rpoB* gene were identified at codons 447 and 457. Notably, for the first time, this study identified mutations outside the RRDR region of the *rpoB* gene at nucleotides 226, 617, 1191, and 2555. No mutations were detected in the *rbpA* gene region. This study identified novel mutations in the *rpoB* gene, both inside and beyond the RRDR, in rifampin-resistant isolates.

Key Words: *M. Kansasii*, drug resistance, mutation, Sanger sequencing, Next generation sequencing.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xiv
TABLOLAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikobakterilerin Tarihçesi	3
2.2. Mikobakterilerin Özellikleri	4
2.3. Mikobakteri Genomunun Özellikleri ve Önemi	5
2.3.1. Lipit Metabolizması Genleri	6
2.3.2. Virülans Faktörleri	6
2.3.3. Stres Tepki Genleri	6
2.3.4. Yatay Gen Transferi ve Plazmidler	6
2.4. Hücre Duvarı Yapısı ve Fonksiyonel Önemi	6
2.5. Mikobakteri Hücre Duvarının Bileşenleri ve İşlevleri	7
2.6. Mikobakteri Hücre Duvarının Fonksiyonel Önemi	8
2.6.1. Yapısal Bütünlük	8
2.6.2. Bağışıklık Kaçışı	8
2.6.3. Antibiyotik Hedefi	8
2.7. Peptidoglikan Sentezinde Görev Alan Anahtar Enzimler	8
2.8. Mikobakteri Taksonomisi	9
2.8.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi (MTBK)	9

	x
2.8.2. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM)	10
2.8.3. Geleneksel Taksonomi	10
2.8.4. Moleküler Taksonomi	10
2.8.5. Mycobacterium Cinsinin Yeniden Düzenlenmesi	10
2.9. <i>Mycobacterium kansasii</i> Patojenezi	11
2.9.1. Giriş ve Kolonizasyon	11
2.9.2. Konak Bağışıklık Yanıtlarından Kaçış	11
2.9.3. Bağışıklık Aktivasyonu ve Granülom Oluşumu	11
2.9.4. Doku Hasarı ve Klinik Belirtiler	12
2.9.5. Virülans Faktörleri	12
2.9.6. Konak Duyarlılığı	12
2.10. <i>M. kansasii</i> 'nin Neden Olduğu Hastalıklar	13
2.10.1. Pulmoner Hastalık	13
2.10.2. Lenfadenit	13
2.10.3. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları	13
2.10.4. Yaygın Hastalık	14
2.10.5. Ekstrapulmoner Bulgular	14
2.10.6. Risk Faktörleri	14
2.11. <i>Mycobacterium kansasii</i> Enfeksiyonunun Tanısı	14
2.11.1. Klinik Bulgular	15
2.11.2. Radyolojik Bulgular	15
2.11.3. Mikrobiyolojik Testler	15
2.11.4. Moleküler Tanı	15
2.11.5. Fenotipik Tanımlama	16
2.11.6. Histopatolojik İnceleme	16
2.12. <i>Mycobacterium kansasii</i> Enfeksiyonunun Tedavisi	16
2.12.1. Standart Birinci Basamak Tedavi	16
2.12.2. Tedavi Süresi	17
2.12.3. İlaç Duyarlılık Testi ve Alternatif Rejimler	17
2.12.4. Ekstrapulmoner ve Yaygın Hastalık	17
2.12.5. Destekleyici Tedaviler	17
2.12.6. HIV-Seropozitif Hastalarda Özel Hususlar	17
2.12.7. Cerrahi Müdahaleler	18

	xi
2.13. Sanger Dizileme: Prensipleri ve Mekanizması	18
2.13.1. Sanger Dizilemenin Uygulamaları	19
2.14. Yeni Nesil Dizileme	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. <i>M. kansasii</i> İzolatları	22
3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	22
3.3. <i>M. kansasii</i> İzolatlarının Löwenstein-Jensen Besiyerinde Üretilmesi	24
3.4. <i>M. kansasii</i> İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	24
3.5. DNA İzolasyonu	25
3.6. <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> ve <i>rml</i> gen bölgelerinin PZR ile Çoğaltılması	26
3.7. Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulanması	28
3.8. PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu	31
3.9. DNA Miktar Tayini	33
3.10. Sanger Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing)	36
3.11. Cycleseq Pürifikasyon	37
3.12. Sanger Dizileme Aşaması	40
3.13. Hedefe Yönelik Yeni Nesil Dizileme	41
3.14. DNA Miktar Tayini	43
3.15. <i>ropB</i> ve <i>RbpA</i> gen bölgelerinin PZR ile Çoğaltılması	43
3.16. Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulanması	45
3.17. GridION kütüphanesinin hazırlanması	45
3.18. Nanopore Amplikon Dizileme Veri Analizi	48
3.19. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	48
4. BULGULAR	49
4.1. İlaç Duyarlılık Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	49
4.2. PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	55
4.3. Sanger Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	57
4.4. Oxford Nanopore (ONT) Hedefe Yönelik Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	59
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	73
7. KAYNAKLAR	75
8. EKLER	85

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

EK-2: Tez Çalışması Dijital Makbuzu ve Orijinallik Raporu

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER ve KISALTMALAR

AG	Arabinogalaktan
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
Bç	Baz çifti
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
GC	Guanin-Sitozin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
INH	İzoniazid
LAM	Lipoarabinomannan
LM	Lipomannan
LJ	Löwenstein-Jensen
MGIT	Mycobacterium Growth Indicator Tube
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MTBK	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi
NALC	N-asetil-L-sistein
NGS	Next Generation Sequencing (Yeni nesil dizileme)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)
PG	Peptidoglikan
PIM	Fosfatidil-miyo-inositol mannosid
RIF	Rifampisin
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
3.1. ‘Sensititre SLOMYCO’ plakaları (TREK Diagnostic Systems, Birleşik Krallık).	25
3.2. FluoroLyse kiti (Hain Lifescience, Nehren, Germany)	26
3.3. Taq premiks 2x (Genet Bio Inc)	27
3.4. ‘Labcyclers Basic’ (SensoQuest GmbH) termal döngü cihazı	28
3.5. UltraPure tampon ve agaroz RA	29
3.6. Ultra GelRed	29
3.7. Jel elektroforez ekipmanı	30
3.8. ‘BioRad ChemiDoc MP Imaging System’ (Universal Hood III, USA) cihazı	3 0
3.9. ‘KAPA Pure Beads’	32
3.10. Manyetik ayrıştırma rakı (magnetic rack)	32
3.11. Manyetik ayrıştırma rakı (magnetic rack)	33
3.12. ‘Qubit™ dsDNA HS Assay’ kiti	34
3.13. Qubit™ Flex ve Qubit™ 4 Fluorometresi	34
3.14. Qubit™ Flex ile DNA konsantrasyon ölçümü	35
3.15. ‘BrilliantDye™ Terminator (v3.1) Cycle Sequencing’ kiti	37
3.16. ‘Mag-Bind® SeqDTR Purification’ kiti	38
3.17. ‘MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate’ ve Septa	39
3.18. “ABI 3500” Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA).	39
3.19. ‘MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate’ ve Septa	40
3.20. ‘Native Barcoding Kit 96 V14’ (SQK-NBD114.96)	42
3.21. ‘SpotON Flow cell’	47
3.22. ‘GridION cihazı’	47
3.23. Minknow Uygulaması	48
4.1. 1-40 numaralı <i>M. kansasii</i> (<i>gyrA</i>) izolatlarının PZR ürünleri; 1: moleküler ağırlık standardı (Ladder) ; 42: pozitif kontrol; 43: moleküler ağırlık standardı (Ladder); 44: negatif kontrol	55

- 4.2. 1-40 numaralı *M. kansasii* (*gyrB*) izolatlarının PZR ürünleri; 1: moleküler ağırlık standardı (Ladder) ; 42: pozitif kontrol; 43: moleküler ağırlık standardı (Ladder); 44: negatif kontrol 56
- 4.3. 1-40 numaralı *M. kansasii* (*rrl*) izolatlarının PZR ürünleri; 1: moleküler ağırlık standardı (Ladder) ; 42: pozitif kontrol; 43: moleküler ağırlık standardı (Ladder); 44: negatif kontrol 56
- 4.4. 1-40 numaralı *M. kansasii* (*rbpA*) izolatlarının PZR ürünleri; 1: moleküler ağırlık standardı (Ladder) ; 42: pozitif kontrol; 43: moleküler ağırlık standardı (Ladder); 44: negatif kontrol 57
- 4.5. Örnek 3258 *gyrA*. (Görüntü Seqtrace versiyon 9.0 yazılım programından alınmıştır.) 58
- 4.6. Örnek 3258 *gyrB*. (Görüntü Seqtrace versiyon 9.0 yazılım programından alınmıştır.) 58
- 4.7. Örnek 3258 *rrl*. (Görüntü Seqtrace versiyon 9.0 yazılım programından alınmıştır.) 59

TABLULAR

Tablo	Sayfa
3.1. <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> ve <i>rrl</i> genlerin çoğaltılması için kullanılan primerler	27
3.2. PZR bileşenleri	27
3.3. Dizileme reaksiyonu bileşenleri	36
3.4. Sanger dizileme aşamasında uygulanan PZR döngü koşulları	36
3.5. PZR bileşenleri	44
3.6. <i>ropB</i> çoğaltmasında PZR döngü koşulları	44
3.7. <i>rbpA</i> çoğaltmasında PZR döngü koşulları	44
4.1. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin MİK ($\mu\text{g}/\text{mL}$) sonuçları.	50
4.2. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin MİK ($\mu\text{g}/\text{mL}$) sonuçları.	52
4.3. <i>M. kansasii</i> klinik izolatları için ilaç duyarlılık sonuçları.	54
4.4. <i>M. kansasii</i> izolatlarının <i>rpoB</i> genindeki mutasyonların dağılımı.	60

1. GİRİŞ

Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) veya atipik mikobakteriler, tüberküloza neden olan *Mycobacterium tuberculosis* ve lepra etkeni *Mycobacterium leprae*'den farklılık gösteren, geniş bir tür çeşitliliği barındıran mikobakterilerdir. Bu bakteriler çevrede yaygın olarak bulunan, toprak ve su gibi doğal ortamlarda yer alan, saprofit veya fırsatçı patojen olarak sınıflandırılabilen mikroorganizmalardır. TDM'ler hem insanlarda hem de hayvanlarda enfeksiyonlara neden olabilir ve özellikle kronik hastalıklar ya da immünosupresyon gibi predispozan durumlara sahip bireylerde pulmoner ve ekstrapulmoner hastalıklara yol açabilir (1).

Günümüze 200'den fazla TDM türü tanımlanmıştır ve bazı türlerin hem immün sistemi sağlam hem de immün sistemi baskılanmış bireylerde ciddi enfeksiyonlara neden olabildiği bildirilmiştir (2). TDM enfeksiyonlarının bildirilmesinin zorunlu olmaması nedeniyle bu enfeksiyonların epidemiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar TDM enfeksiyonlarının görülme sıklığında küresel düzeyde belirgin bir artış olduğunu ortaya koymaktadır (3). *Mycobacterium kansasii*, yavaş üreyen tüberküloz dışı mikobakterilerden biridir ve tüberküloza oldukça benzeyen akciğer hastalıklarına neden olan iyi bilinen bir patojendir. Doğal su kaynakları ve su dağıtım sistemlerinde yaygın olarak bulunan bu bakteri hem immün sistemi sağlam hem de immün sistemi baskılanmış bireylerde enfeksiyon oluşturabilir (2).

M. kansasii, moleküler ve genetik çalışmalara göre Genotip 1'den Genotip 7'ye kadar en az yedi alt tür (genotip) ile sınıflandırılmıştır. Klinik vakalarda en sık izole edilen genotip, Genotip 1'dir ve insan hastalıkları ile yakından ilişkilidir. Diğer genotipler ise genellikle çevresel örneklerde tespit edilmekte olup, farklı patojenik potansiyele sahiptir (4). Alt türler arasındaki bu farklar, virülans, klinik tablo ve antibiyotik duyarlılığı gibi özelliklerde değişikliklere yol açmakta ve tedavi yaklaşımlarını etkilemektedir (2). *M. kansasii* enfeksiyonlarının tedavisinde karşılaşılan en önemli zorluklardan biri, bu bakterinin ilaç direnci geliştirme kapasitesidir.

M. kansasii genellikle rifampin, izoniazid, etambutol ve makrolidlere duyarlı olmasına rağmen, bazı izolatlarda bu antibiyotiklere karşı direnç geliştiği bildirilmiştir ve bu durum tedavi protokollerini karmaşıklaştırmaktadır. Rifampin direnci özellikle, RNA polimerazın β -alt birimini kodlayan *rpoB* genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. İzoniazid direnci, *katG* veya *inhA* genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanabilirken, makrolid direnci 23S rRNA genindeki değişikliklerle bağlantılıdır (5). Ayrıca, dışa atım (efluks) pompa sistemleri ve hücre duvarı geçirgenliğindeki değişiklikler gibi intrinsik direnç mekanizmaları, çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılığı azaltmaktadır (6).

M. kansasii enfeksiyonlarının tedavisinde genellikle rifampin, etambutol ve izoniazid veya bir makrolid içeren kombinasyon tedavisi uygulanmaktadır. Bu tedavi, hastalığın şiddeti ve ilaç duyarlılığı profiline bağlı olarak 12 ila 18 ay sürebilir (7). *M. kansasii* izolatlarındaki direnç mekanizmalarının ve genetik çeşitliliğin anlaşılması, tedavi protokollerinin iyileştirilmesi ve ilaç dirençli suşların ortaya çıkmasının önlenmesi açısından hayati öneme sahiptir.

Bu çalışmada, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında moleküler yöntemlerle *Mycobacterium kansasii* olarak tanımlanan 40 izolattın, SLOMYCO paneli (yavaş üreyen mikobakteri türleri için) kullanılarak antimikrobiyal duyarlılık profilleri, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M24S-Ed2) rehberi önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. İlaç duyarlılık testlerine ek olarak, fenotipik olarak klaritromisin, siprofloksasin ve rifampine dirençli olduğu belirlenen *M. kansasii* izolatlarında direnç mekanizmalarını incelemek amacıyla, *gyrA*, *gyrB* ve *rrl* genlerindeki mutasyonlar Sanger dizileme yöntemiyle, *rpoB* ve *rpba* genlerindeki mutasyonlar ise Oxford Nanopore (Yeni Nesil Dizileme) yöntemiyle analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikobakterilerin Tarihçesi

Mycobacterium tuberculosis'in (*M. tuberculosis*) tarihi, bakterinin 19. yüzyılda resmi olarak tanımlanmasından çok daha öncesine dayanır ve insan hastalıklarıyla uzun bir ilişki içerisinde. Arkeolojik ve paleopatolojik kanıtlar, tüberkülozun (TB) binlerce yıldır insanları etkilediğini ortaya koymaktadır. Eski Mısır mumyalarında ve Amerika'daki iskelet kalıntılarında hastalığın karakteristik lezyonları gözlemlenmiştir (8). Ayrıca, Hipokrat'ın yazıları gibi antik kaynaklarda, TB'ye özgü semptomlara atıfta bulunulmuş, bu da hastalığın antik medeniyetlerde yaygın bir sağlık sorunu olduğunu göstermiştir (9).

Orta Çağ boyunca tüberküloz, "tüketim" adıyla bilinen ve genellikle etkilenen bireylerin aşırı zayıf görünümüne gönderme yapılan bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Hastalık, kronik seyri ve yüksek ölüm oranıyla toplumsal bir tehdit olarak tanımlanmış ve geniş kitleler üzerinde yıkıcı etkiler bırakmıştır (10). Bu dönemde, aşırı kalabalıklaşma, kötü hijyen koşulları ve yetersiz sanitasyon gibi sosyoekonomik ve çevresel faktörler, hastalığın hızla yayılmasına olanak sağlamış ve Avrupa'nın kent merkezlerinde salgınlara yol açmıştır (11).

Tüberkülozun bulaşıcı doğası hakkındaki ilk somut bulgular, 19. yüzyılda yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Jean-Antoine Villemin'in 1865 yılında gerçekleştirdiği deneyler, TB'nin bulaşıcı bir hastalık olduğunu kesin olarak göstermiş ve bu alandaki gelecekteki keşiflere zemin hazırlamıştır. Bu dönemde aynı zamanda, hastalara temiz hava ve dinlenme imkânı sunmak amacıyla sanatoryumlar kurulmaya başlanmıştır. Sanatoryumların yaygınlaşması, toplumda TB'nin bulaşıcı bir hastalık olarak daha fazla tanınmaya başlamasının bir göstergesi olmuştur (8). Bu tarihsel gelişmeler, Robert Koch'un 1882 yılında tüberküloz basilini keşfetmesiyle doruk noktasına ulaşmıştır. Koch, TB'nin etkeni olarak *M. tuberculosis*'i kesin olarak tanımlamış ve bu bulaşıcı hastalığın biyolojisini anlama konusunda devrim yaratmıştır. Aynı zamanda bu keşif, modern bakteriyoloji ve halk sağlığı müdahalelerinin başlangıcını işaret etmiş ve TB'nin kontrol altına alınması için yeni stratejilerin

geliştirilmesine olanak sağlamıştır (12). Cüzzamın etkeni olan *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), ilk kez 1873 yılında Norveçli hekim Gerhard Armauer Hansen tarafından keşfedilmiştir. Hansen'in bu bakteriyi tanımlaması, bir bakterinin ilk kez kesin bir şekilde insan hastalığıyla ilişkilendirildiği önemli bir bilimsel dönüm noktası olmuştur. Bu keşif, *M. leprae*'nin aynı zamanda "Hansen basili" olarak anılmasına yol açmıştır (13). İlk tanımlanan tüberküloz-dışı mikobakteri (TDM) türleri *Mycobacterium avium* ve *Mycobacterium intracellulare*, 19. yüzyılın sonları ile 20. yüzyılın başlarında keşfedilmiştir. 1896 yılında Lehmann ve Neumann, aside dirençli boyama özellikleriyle dikkat çeken basilleri sınıflandırarak *Mycobacterium* cinsini oluşturmuştur (14). *Mycobacterium kansasii*, 1905 yılında Kansas'taki bir laboratuvarında bulunmuş ve çevresel bir mikobakterinin insan hastalıklarıyla ilişkilendirildiği ilk örneklerden birini temsil etmiştir (15).

2.2. Mikobakterilerin Özellikleri

Mikobakteriler, aerobik, hareketsiz ve çubuk şeklinde bakterilerdir. Bu organizmalar, serbest yaşayan saprofitler olarak ya da insanlar ve hayvanlarda patojen olarak bulunabilirler. Mikobakteriler yavaş üreme hızına sahiptir ve bazı türlerinin kültür ortamında görünür koloniler oluşturabilmesi haftalar alabilir (16). Mikobakteriler gram-pozitif bakteriler olarak sınıflandırılır; ancak, benzersiz hücre duvarı yapıları standart Gram boyama yöntemlerini engeller. Bu nedenle, Ziehl-Neelsen boyama yöntemi gibi aside dirençli boyama yöntemlerinin kullanılması gereklidir (17).

Ziehl-Neelsen boyama yöntemi, aside dirençli basil (ARB) olarak bilinen organizmaları, özellikle *Mycobacterium* cinsine ait olanları tespit etmek için kullanılan bir diferansiyel boyama yöntemidir. Bu yöntem, *M. tuberculosis* ile ilişkili hastalıkların, diğer mikobakteriyel enfeksiyonların ve bazı *Nocardia* türlerinin teşhisinde temel bir rol oynar (18).

Ziehl-Neelsen boyama yöntemi, mikobakterilerin hücre duvarının yüksek miktarda mikolik asit içeren özgün yapısına dayanır. Uzun zincirli yağ asitleri, hücre duvarına mumsu ve hidrofobik bir özellik kazandırarak çoğu sulu boyanın geçişini engeller. Bu boyama yönteminde, fenol türevi bir boya olan karbol fuksin kullanılır.

Isı uygulaması ile birlikte boya, lipid açısından zengin hücre duvarına nüfuz ederek bağlanmasını sağlar (17). Aside dirençli organizmalar, asit-alkol ile yapılan dekolorizasyon işleminden sonra kırmızı boyayı muhafaza ederken, aside dirençli olmayan hücrelere metilen mavisi ile karşıt boyama yapılır (19).

Ziehl-Neelsen boyama yönteminde ilk aşama birincil boyama aşamasıdır. Bu aşamada preparat, karbol fuksin ile kaplanır ve boyanın, lipid açısından zengin hücre duvarına nüfuz etmesini kolaylaştırmak için ısı uygulanır. İkinci aşamada (dekolorizasyon) lam yüzeyine %3 HCl içeren asit alkol uygulanır. Bu işlem, aside dirençli olmayan hücrelerden boyayı uzaklaştırırken, aside dirençli basillerde boyanın kalmasını sağlar. Son aşamada ise metilen mavisi kontrast boya olarak uygulanır. Bu işlem, aside dirençli olmayan hücrelerin boyanmasını sağlayarak zemin ile kontrast oluşturur. Mikroskopik incelemede aside dirençli basiller parlak kırmızı renkte, zemin ve diğer yapılar ise mavi renkte görünür. Bu durum, basillerin görünürlüğünü artırır (20). Ziehl-Neelsen boyama yöntemi aside dirençli basiller için özgül olsa da kültür ve PZR gibi moleküler yöntemlere kıyasla duyarlılığı düşüktür. Ayrıca bu yöntem, örneğin aşırı boyanmasını veya tahribatını önlemek için deneyimli personel ve uygun ısı uygulaması gerektirir.

2.3. Mikobakteri Genomunun Özellikleri ve Önemi

Mikobakterilerin genomu, bu cinsin en ilgi çekici yönlerinden biridir ve onların adaptasyon yeteneklerine, hayatta kalma stratejilerine ve patojenitelerine önemli ölçüde katkıda bulunur. Mikobakteri genomlarının incelenmesi, biyolojileri, evrim süreçleri ve hastalık mekanizmaları hakkında kritik bilgiler sağlamıştır. Mikobakteriler, bakteriler arasında nispeten büyük genomlara sahiptir ve bu genomlar türlere bağlı olarak genellikle 3,5 ila 7,0 Mbp arasında değişir. Örneğin, *M. tuberculosis* genomu yaklaşık 4,4 Mbp büyüklüğündedir ve yaklaşık 4.000 gen kodlamaktadır (21). Buna karşılık, *M. leprae* genomu kapsamlı bir şekilde küçülmüş olup, yalnızca 3,27 Mbp büyüklüğündedir ve 1.604 işlevsel gen içermektedir. Bu durum, *M. leprae*'nin konağa bağımlılığını yansıtmaktadır (22). Mikobakteri genomları, tipik olarak %65-70 arasında değişen yüksek guanin-sitozin (GC) içeriği ile karakterizedir. Bu yüksek GC içeriği, genom stabilitesine katkıda bulunur ve

mikroorganizmaların, konak makrofajlarının içinde dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda hayatta kalma yeteneğini artırır (23).

2.3.1. Lipit Metabolizması Genleri

Mikobakteriler, özellikle mikolik asitlerin sentezi ve modifikasyonunda görev alan enzimleri kodlayan genler olmak üzere, lipit metabolizmasına ayrılmış alışılmadık derecede yüksek sayıda gene sahiptir. Bu lipitler, bakterilerin hücre duvarı yapısı ve patojenitesi için kritik öneme sahiptir (24).

2.3.2. Virülans Faktörleri

Patojenik mikobakteriler, konak bağışıklık yanıtlarını modüle etmekte rol oynayan ESX salgı sistemleri gibi birçok virülans faktörünü kodlar. Özellikle ESX-1 salgı sistemi, *M. tuberculosis*'in virülansı için hayati öneme sahiptir (25).

2.3.3. Stres Tepki Genleri

Mikobakteriler, makrofaj fagositozu gibi stres koşullarında hayatta kalmalarını sağlayan bir dizi gene sahiptir. Bu genler arasında ısı şoku proteinleri, oksidatif stres yanıt enzimleri ve dormansi düzenleyicileri bulunmaktadır (26).

2.3.4. Yatay Gen Transferi ve Plazmidler

Mikobakterilerde yatay gen transferi, diğer bakterilere kıyasla daha az yaygın olmasına rağmen, *M. abscessus* gibi bazı türler, antibiyotik direnci ve çevresel adaptasyona katkıda bulunan plazmidler ve hareketli genetik elemanlar taşımaktadır (27).

2.4. Hücre Duvarı Yapısı ve Fonksiyonel Önemi

Mikobakteri hücre duvarı, bu cinse özgü belirleyici bir yapı olup, kendine has boyanma özelliklerinden, antibiyotik direncinden ve virülanstan sorumludur. Yapısal olarak karmaşık olan bu duvar, üç ana tabakadan oluşur: iç sitoplazmik membran, peptidoglikan tabakası ve mikolik asitlerden oluşan dış lipit açısından zengin tabaka (17). Peptidoglikan tabakası, mikobakteri hücre duvarının hem yapısal hem de işlevsel

bir bileşenidir. Bu tabaka, çevresel strese karşı dayanıklılık sağlarken bakterinin çubuk şeklindeki morfolojisini korur. *Mycobacterium tuberculosis* ve diğer türlerde, bu tabaka kimyasal olarak benzersizdir ve patojenitelerinde ve antimikrobiyal ajanlara dirençlerinde merkezi bir rol oynar. Mikobakterilerdeki peptidoglikan tabakası, glikan zincirlerinin kısa peptit zincirleriyle çapraz bağlandığı ağ benzeri bir polimerden oluşur. Peptidoglikanın omurgası, N-asetilglukozamin (NAG) ve mikobakterilere özgü bir muramik asit formu olan N-glikolilmuramik asit (NGM) birimlerinden oluşur (28). Bu modifikasyon, diğer bakterilerde bulunan N-asetilmuramik asidin yerine geçerek hücre duvarının yapısal bütünlüğüne ve direncine katkıda bulunur (29). Peptidoglikan tabakası, mikobakterilere özgü bir polisakkarit olan arabinogalaktan ile fosfodiester bağları aracılığıyla kovalent olarak bağlıdır. Bu bağlantıya, hücre duvarının lipit açısından zengin dış tabakasını oluşturan uzun zincirli yağ asitleri olan mikolik asitlerin de bağlanmasıyla çok sağlam bir koruyucu yapı oluşur (30).

2.5. Mikobakteri Hücre Duvarının Bileşenleri ve İşlevleri

Peptidoglikan tabakası, hücre duvarına yapısal bütünlük kazandırır. Mikobakterilere özgü bir polisakkarit olan arabinogalaktan ile kovalent bağ oluşturarak sert bir iskelet yapısı oluşturur (28). Arabinogalaktan, mikolik asitler ile esterleşmiştir. Mikobakterilere özgü olan bu uzun zincirli yağ asitleri, hidrofobik bir bariyer oluşturarak mikobakterilerin aside dirençli özelliklerini kazanmasına ve kuruma, kimyasal dezenfektanlar ve antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine katkıda bulunur (30). Dış tabaka, trehaloz dimikolat (kord faktörü), fosfatidilinozitol mannozidler (PIM'ler) ve lipoarabinomannan (LAM) gibi kompleks lipitler içerir. Bu lipitler, konak bağışıklık yanıtını modüle etmede, bağışıklıktan kaçışa yardımcı olmada ve patojeniteye katkıda bulunmada önemli bir rol oynar (31).

Mikobakterilerde tipik bir dış membran bulunmaz, ancak besin alımını kolaylaştırmak için lipit tabakaya gömülü porinler içerirler. Dışa atım pompaları, toksik maddeleri hücre dışına atarak antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlerini daha da artırır (32).

2.6. Mikobakteri Hücre Duvarının Fonksiyonel Önemi

2.6.1. Yapısal Bütünlük

Peptidoglikan tabakası, hücre duvarının mekanik dayanıklılığını koruyarak, ozmotik stres altında lizisi önler. Bu durum, özellikle mikobakterilerin makrofajlar içinde hayatta kalması için kritik öneme sahiptir (33).

2.6.2. Bağışıklık Kaçışı

Bakteriyel üreme sırasında salınan peptidoglikan parçacıkları, konak immün yanıtlarını modüle edebilir. Mikobakterilere özgü peptidoglikan türevleri, konak desen tanıma reseptörlerini etkileyerek immün yanıtı kaçırmaya katkıda bulunur (34).

2.6.3. Antibiyotik Hedefi

Peptidoglikan biyosentez yolu, antibiyotikler için önemli bir hedef olarak kabul edilir. Örneğin etambutol, arabinogalaktan sentezinde görevli enzimleri inhibe ederek peptidoglikan tabakasının bütünlüğünü dolaylı olarak etkiler (35). Bununla birlikte, mikobakteri peptidoglikanının benzersiz özellikleri, birçok β -laktam antibiyotiğe karşı doğal dirence katkıda bulunur (36).

2.7. Peptidoglikan Sentezinde Görev Alan Anahtar Enzimler

Mur enzimleri, peptidoglikan öncüllerinin sitoplazmada sentezlendiği erken basamakları katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimler, UDP-N-asetilmuramil pentapeptit sentezinde görev alarak peptidoglikan biyosentezinin temel taşlarını oluşturur (37). Süreç, N-asetilglukozamin (GlcNAc) ve fosfoenolpiruvatın birleştirilmesiyle başlar; bu aşama, bakteriyel hücre duvarının inşası için kritik öneme sahiptir (38). Mur enzimlerinin inhibisyonu, hücre duvarı sentezinin durmasına neden olur ve bakterilerin büyümesini engeller (39).

Bu nedenle, Mur enzimleri, antibiyotiklerin hedefleri arasında yer alır ve yeni antibiyotik geliştirme çalışmalarında büyük bir öneme sahiptir. Penisilin bağlayıcı proteinler (PBPs), peptidoglikanın üç boyutlu yapısının oluşumunda kritik rol oynar. Bu enzimler, glikan zincirlerinin polimerizasyonunu katalize ederek ve peptit yan

zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturarak hücre duvarının mekanik dayanıklılığını sağlar (40). PBPs'nin işlevi, özellikle β -laktam antibiyotiklerin etkisine açıktır. Ancak mikobakterilerdeki PBPs'nin özgün yapısı, bu bakterilerin β -laktam antibiyotiklere karşı düşük duyarlılık göstermesine neden olmaktadır.

Mikobakterilerde PBPs'nin bağlanma afinitesi düşüktür ve bu durum, β -laktam antibiyotiklerin etkisini sınırlayan başlıca faktörlerden biridir. Bu nedenle, mikobakterilere özgü PBPs'nin yapısal özelliklerinin detaylı olarak incelenmesi, mikobakteri yel enfeksiyonların tedavisi için yeni stratejiler geliştirilmesi açısından önemlidir (40).

2.8. Mikobakteri Taksonomisi

Taksonomi, organizmaları ortak özellikler ve evrimsel ilişkiler temelinde hiyerarşik kategorilere ayıran bir sınıflandırma bilimidir. Mycobacterium cinsi, Actinobacteria şubesine ait olup, içinde *M. tuberculosis* ve *M. leprae* gibi önemli patojenlerin yanı sıra birçok çevresel türü barındıran geniş bir bakteri grubunu kapsar (41).

Mikobakteri cinsinin taksonomik sınıflandırması şu şekildedir:

- Domain: Bacteria
- Phylum: Actinobacteria
- Class: Actinobacteria
- Order: Corynebacteriales
- Family: Mycobacteriaceae

Mycobacterium cinsi, farklı ekolojik rollere sahip türlerden oluşan çeşitli bir grubu temsil etmektedir. Bu grupta zorunlu patojenler, fırsatçı patojenler ve serbest yaşayan çevresel bakteriler bulunmaktadır. Mycobacterium cinsi, iki ana gruba ayrılmıştır:

2.8.1. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBK)

Bu grup, insanlarda ve hayvanlarda tüberküloza neden olan yakından ilişkili türleri içermektedir. MTBK üyeleri arasında *Mycobacterium tuberculosis*,

Mycobacterium bovis, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii* gibi türler yer almaktadır.

2.8.2. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM)

Bu grup, tüberküloz veya cüzzam gibi hastalıklara neden olmayan, ancak fırsatçı patojenler olabilen çevresel mikobakterileri içermektedir. Bu grupta *Mycobacterium avium complex* (MAC) (*M. avium* ve *M. intracellulare*), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* gibi türler yer almaktadır (42).

2.8.3. Geleneksel Taksonomi

Tarihsel olarak mikobakterilerin sınıflandırılması, büyüme hızı, pigment üretimi ve koloni morfolojisi gibi fenotipik özelliklere dayalı olarak yapılmıştır. Runyon'un sınıflandırması, mikobakterileri bu kriterlere dayanarak dört gruba ayırmıştır (43):

- **Fotokromojenler:** Işık varlığında pigment üretenler (ör. *M. kansasii*).
- **Skotokromojenler:** Hem ışıpta hem de karanlıkta pigment üretenler (ör. *M. scrofulaceum*).
- **Kromojen Olmayanlar:** Pigment üretmeyenler (ör. *M. avium*).
- **Hızlı Üreyenler:** Yedi gün içinde üreyenler (ör. *M. abscessus*).

2.8.4. Moleküler Taksonomi

Moleküler biyolojideki ilerlemeler, mikobakterilerin taksonomisini kökten değiştirmiştir. 16S rRNA, hsp65, rpoB genlerinin DNA dizilemesi ve tüm genom analizi gibi yöntemler, türlerin hassas bir şekilde tanımlanmasını ve filogenetik çalışmaların yapılmasını sağlamıştır (44). Bu moleküler teknikler, gizli türleri ortaya çıkarmış ve cins içindeki evrimsel ilişkileri aydınlatmıştır.

2.8.5. *Mycobacterium* Cinsinin Yeniden Düzenlenmesi

Son dönemde yapılan genomik çalışmalar, *Mycobacterium* cinsinin filogenetik ilişkileri daha iyi yansıtabilecek şekilde yeniden sınıflandırılmasını sağlamıştır. Yeniden düzenlenen sınıflandırma, orijinal cinsi aşağıdaki yeni cinslere ayırmıştır (45):

1. **Cins Mycobacterium:** MTBK ve diğ er yavaş üreyen mikobakterileri içerir.
2. **Cins Mycolicibacterium:** *M. abscessus* ve *M. chelonae* gibi birçok hızlı üreyen türü içerir.
3. **Cins Mycolicibacter:** Bazı yavaş üreyen çevresel türleri kapsar.
4. **Cins Mycolicibacillus:** Belirli çevresel mikobakterileri içerir.

2.9. *Mycobacterium kansasii* Patojenezi

M. kansasii, yavaş üreyen ve fotokromojenik özellikte bir mikobakteri olup, tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) grubuna dahildir. Özellikle immün sistemi baskılanmış bireylerde pulmoner ve ekstrapulmoner enfeksiyonlara neden olma kapasitesi ile tanınır. Patogenezi, mikrobiyal virülans faktörleri ile konak immün yanıtları arasındaki karmaşık etkileşimleri içerir.

2.9.1. Giriş ve Kolonizasyon

M. kansasii, genellikle solunum yolu aracılığıyla bulaşır. Su ve toprak gibi çevresel kaynaklar bu patojenin rezervuarlarıdır (2). Organizmanın aerosolize damlacıklar halinde inhalasyonu, alveollerde yerleşmesine ve burada kolonizasyonun başlamasına yol açar. Mikolik asitlerden zengin olan hidrofobik hücre duvarı, epitel yüzeylere yapışma ve kuruluğa direnç yeteneğini artırır (46).

2.9.2. Konak Bağışıklık Yanıtlarından Kaçış

M. kansasii enfeksiyonuna karşı bağışıklık yanıtına, başlangıçta alveoler makrofajlar tarafından aracılık edilir. Patojen, fagositoz sonrası, fagozom-lizozom birleşimini engelleyerek lizozomal parçalanmadan kaçır. Bu yetenek, hücre duvarında bulunan lipitler ve glikopeptidler gibi bileşiklere atfedilir; bu bileşikler konak hücre sinyal yollarını bozar. Ayrıca, *M. kansasii* makrofajlar içinde hayatta kalabilir ve çoğalabilir, bu da kalıcılığına katkıda bulunur (47).

2.9.3. Bağışıklık Aktivasyonu ve Granülom Oluşumu

Sürekli enfeksiyon hem doğal hem de adaptif immün yanıtlarını aktive eder. TLR'ler (Toll-benzeri reseptörler) gibi patern tanıma reseptörleri (PRR'ler), *M.*

kansasii üzerinde bulunan patojenle ilişkili moleküler paternleri (PAMP'ler) tanır. Bu durum, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve interferon-gama (IFN- γ) gibi bağışıklık hücrelerinin toplanmasında kritik olan proinflamatuvar sitokinlerin üretimine yol açar (48). Granülom oluşumu, *M. kansasii* enfeksiyonunun bir göstergesidir. Granülom, bakteriyel yayılımı sınırlamak için konağın bir savunma stratejisi olarak işlev görür. Bununla birlikte, bakteriler granülom içinde latent bir durumda kalabilir ve immünosupresif durumlarda kronik enfeksiyona veya yeniden aktivasyona katkıda bulunabilir (49).

2.9.4. Doku Hasarı ve Klinik Belirtiler

M. kansasii'nin konakta sürekli varlığı, ilerleyici doku hasarına neden olan kronik inflamasyonu tetikler. Pulmoner enfeksiyonlarda bu durum, kavitasyon, fibrozis ve bronşektazi olarak kendini gösterir ve tüberkülozu andırır (50). İmmün sistem hücreleri tarafından salgılanan proteolitik enzimler ve reaktif oksijen türleri (ROS), doku yıkımını daha da şiddetlendirir. Lenfadenit, osteomyelit ve yaygın hastalık gibi ekstrapulmoner belirtiler, özellikle HIV/AIDS'li veya immünosupresif tedavi alan bireylerde daha yaygındır (2).

2.9.5. Virülans Faktörleri

M. kansasii'nin patojenitesini artıran birçok virülans faktörü bulunur: Esx-1 salgı sistemi, hücre içi hayatta kalmayı ve konağın bağışıklık yanıtlarının modülasyonunu kolaylaştırır (51). Hücre duvarı lipitleri, bağışıklık kaçışına ve oksidatif strese dirence katkıda bulunur. Katalaz-peroksidaz enzimi (KatG), konak bağışıklık sistemi tarafından üretilen reaktif oksijen türlerine karşı bakteriyi korur.

2.9.6. Konak Duyarlılığı

Konak faktörleri, *M. kansasii*'nin patogeneğinde önemli bir rol oynar. IFN- γ ve reseptörünü kodlayan genlerdeki polimorfizmler gibi genetik yatkınlıkların, artan duyarlılıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, HIV enfeksiyonu, steroid kullanımı ve maligniteler gibi immünosupresif durumlar ciddi hastalık riskini artırır (52).

2.10. *M. kansasii*'nin Neden Olduğu Hastalıklar

M. kansasii, öncelikli olarak solunum sistemi enfeksiyonlarına yol açan, ancak ekstrapulmoner bulgulara da neden olabilen önemli bir patojendir. Bu enfeksiyonların klinik belirtileri geniş bir yelpazede değişkenlik gösterir ve genellikle konağın bağışıklık durumu ve altta yatan sağlık koşullarından etkilenir.

2.10.1. Pulmoner Hastalık

Pulmoner hastalık, *M. kansasii* enfeksiyonunun en yaygın klinik sonucudur ve genellikle tüberkülozu andırır (2). Bu hastalık, genellikle kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), bronşektazi veya sigara öyküsü gibi altta yatan rahatsızlıkları olan yetişkinleri etkiler (46). Hastalar sıklıkla kronik öksürük, hemoptizi, ateş, gece terlemeleri, halsizlik ve kilo kaybı gibi semptomlarla başvurur (2). Radyolojik incelemelerde üst lob kaviteasyonu, nodüler infiltrasyonlar ve fibrozis görülür. Bu bulgular tüberkülozla benzerlik gösterir ancak *M. kansasii* enfeksiyonlarında ilerleme daha yavaştır (48).

2.10.2. Lenfadenit

Servikal lenfadenit, özellikle çocuklarda sık görülen bir başka klinik belirtidir (47). Bu durum genellikle boyun bölgesinde ağrısız lenf nodu şişliği ile karakterizedir (49). İlerlemiş olgularda apse oluşumu ve sinüs traktı gelişimi görülebilir (47). Bağışıklığı baskılanmış yetişkinlerde lenfadenit daha nadir görülmekle birlikte, pulmoner hastalığa göre daha az sıklıkla ortaya çıkar.

2.10.3. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

M. kansasii, genellikle travma veya invaziv tıbbi müdahaleler sonrası deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olabilir. Bu enfeksiyonlar nodüller, ülserler veya apseler şeklinde ortaya çıkabilir ve bazen selülit veya tenosinovit gibi derin doku tutulumuna ilerleyebilir (53). Bu enfeksiyonlar, kontamine su veya toprakla mesleki temas yaşayan bireylerde daha sık görülür (51).

2.10.4. Yaygın Hastalık

Yaygın *M. kansasii* enfeksiyonları, neredeyse yalnızca ileri HIV/AIDS, organ nakli veya immünosupresif tedavi gören ciddi şekilde bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ortaya çıkar. Sistemik belirtiler arasında ateş, kilo kaybı, gece terlemeleri, halsizlik yer alır ve genellikle karaciğer, dalak ve kemik iliği gibi organların tutulumu eşlik eder. Yaygın hastalık, ciddi morbidite ile ilişkilidir ve zamanında tedavi gerektirir (49).

2.10.5. Ekstrapulmoner Bulgular

M. kansasii'nin ekstrapulmoner tutulumu daha az yaygın olmakla birlikte, kemikler, eklemler, genitoüriner sistem ve gastrointestinal sistem gibi çeşitli sistemleri etkileyebilir. Osteomyelit ve septik artrit genellikle hematolojik yayılım veya komşu enfeksiyonlardan kaynaklanır (54). Renal ve üriner sistem enfeksiyonları hematüri, dizüri gibi özgül olmayan semptomlara yol açabilir. Gastrointestinal sistem tutulumu nadirdir ancak karın ağrısı ve ishal gibi belirtilerle kendini gösterebilir (55).

2.10.6. Risk Faktörleri

Bir dizi faktör, *M. kansasii* enfeksiyonlarına duyarlılığı artırır. KOAH, kistik fibroz veya silikoz gibi kronik akciğer hastalıklarına sahip bireyler pulmoner enfeksiyonlar için daha yüksek risk altındadır (56). Düşük CD4 sayısına sahip HIV enfeksiyonu, organ nakli veya tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) hedefli biyolojik ajanların kullanımı gibi immünosupresif durumlar, ciddi ve yaygın hastalık formlarına yatkınlık oluşturur. Uzun süreli kortikosteroid kullanımı ve kemoterapi de riski artırır (57).

2.11. *Mycobacterium kansasii* Enfeksiyonunun Tanısı

M. kansasii enfeksiyonunun tanısı, klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik bulguların bir arada değerlendirilmesini gerektirir. Klinik belirtilerin genellikle tüberküloz ve diğer solunum yolu hastalıklarını taklit etmesi nedeniyle, doğru tanı stratejileri etkin tedavi için hayati önem taşır.

2.11.1. Klinik Bulgular

M. kansasii enfeksiyonuna ilişkin ilk şüphe, genellikle kronik öksürük, hemoptizi, kilo kaybı, ateş ve gece terlemeleri gibi klinik semptomlardan kaynaklanır; bu semptomlar tüberküloza oldukça benzerdir. Pulmoner semptomlar en yaygın olanlarıdır, ancak immün sistemi baskılanmış hastalarda lenfadenit, deri lezyonları ve yaygın hastalık gibi ekstrapulmoner belirtiler de görülebilir (58).

2.11.2. Radyolojik Bulgular

Akciğer grafisi ve BT taramaları, *M. kansasii*'nin neden olduğu pulmoner enfeksiyonlarla ilişkili anormalliklerin tanımlanmasında önemli bir rol oynar. Tipik bulgular arasında üst lob kavitasyonu, nodüler infiltrasyonlar ve fibrozis yer alır. Bu bulgular *M. tuberculosis*'in neden olduğu lezyonlardan genellikle ayırt edilemez (59). Ancak tüberküloza kıyasla daha yavaş ilerleyen radyolojik değişiklikler, tanı için ince bir ipucu sağlayabilir (60).

2.11.3. Mikrobiyolojik Testler

M. kansasii enfeksiyonunun kesin tanısı için mikrobiyolojik doğrulama kritik öneme sahiptir. Anahtar tanı teknikleri şunlardır:

- Balgam Kültürü: *M. kansasii*, en sık test edilen örnek olan balgam gibi solunum örneklerinden izole edilebilir (2). Yavaş üreyen bir organizma olup, Lowenstein-Jensen veya Middlebrook 7H10 agarda tipik olarak 4-6 hafta inkübasyon süresi gerektirir (61).
- Mikroskopik İnceleme: Ziehl-Neelsen veya Kinyoun gibi aside dirençli boyama yöntemleri mikobakterilerin varlığını ortaya koyar; ancak tür tanımlaması için ek testler gereklidir (61).

2.11.4. Moleküler Tanı

Moleküler teknikler, *M. kansasii*'nin tür düzeyinde hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasında kritik öneme sahiptir.

- Nükleik Asit Çoğaltma Testleri (NAATs): PZR ve diğer NAAT'ler, *M. kansasii* DNA'sının varlığını doğrulamak için 16S rRNA geni gibi özgül genetik

belirteçleri hedefler (62).

- Dizileme: *hsp65* ve *rpoB* genlerinin dizilenmesi, diğer tüberküloz dışı mikobakterilerden ayırt edilmesinde yüksek özgüllük sağlar (63).

2.11.5. Fenotipik Tanımlama

M. kansasii, ışığa maruz kaldığında sarı pigment üreten fotokromojenik bir mikroorganizmadır. Bu özellik, tür tayininde diğer tüberküloz dışı mikobakterilerden ayırt edilmesine olanak tanır (2).

2.11.6. Histopatolojik İnceleme

Etkilenen bölgelerden alınan doku biyopsisi örnekleri, enfeksiyonun evresine ve ciddiyetine bağlı olarak kazeöz veya kazeöz olmayan nekrozla birlikte granülomatöz inflamasyon gösterebilir. Doku kesitlerinde aside dirençli boyama yöntemleri ile mikobakteri varlığı gösterilebilir (50).

2.12. *Mycobacterium kansasii* Enfeksiyonunun Tedavisi

M. kansasii enfeksiyonunun tedavisi, patojenin başarılı bir şekilde eradikasyonunu sağlamak ve nüks veya direnç riskini en aza indirmek için kişiselleştirilmiş, kanıta dayalı bir yaklaşımı gerektirir. Tedavi rejimleri, genellikle antimikrobiyal ajanların kombinasyonundan oluşur ve ilaç duyarlılık profilleri, enfeksiyon bölgesi ve hastanın genel sağlık durumu göz önünde bulundurularak seçilir.

2.12.1. Standart Birinci Basamak Tedavi

M. kansasii pulmoner hastalığının standart tedavisi, rifampin, etambutol ve izoniazid içeren bir çoklu ilaç rejimini içerir ve periferik nöropatiyi önlemek için piridoksin (B6 vitamini) ile desteklenir. Rifampin, *M. kansasii*'ye karşı güçlü bakterisidal aktivitesi nedeniyle tedavinin temel taşı olarak kabul edilir. Etambutol, direnç gelişimini önlemek için kullanılırken, izoniazid bakterisidal etkisiyle tedavi etkinliğini artırır (64).

2.12.2. Tedavi Süresi

Tedavi süresi, balgam kültürü dönüşümünü takiben 12 ay olarak önerilmektedir. Bu uzun süre, nüks riskini en aza indirmek için önemlidir. Kültür dönüşümü, genellikle tedaviye başlanmasından birkaç ay sonra sağlanan ve ardışık balgam örneklerinde *M. kansasii* üremesinin olmaması olarak tanımlanır (65).

2.12.3. İlaç Duyarlılık Testi ve Alternatif Rejimler

İlaç duyarlılık testi (DST), dirençli izolatları saptamak ve özellikle başlangıç tedavisi başarısız olduğunda veya direnç şüphesi olduğunda tedaviyi yönlendirmek için hayati öneme sahiptir (66). Rifampin dirençli *M. kansasii* izolatı saptanması durumunda bu hastalar için alternatif rejimler, etambutol ve bir florokinolon (örneğin moksifloksasin veya levofloksasin) ile klaritromisin veya azitromisin içerebilir. Yaygın ilaç direnci durumlarında, amikasin veya linezolid kullanımı düşünülebilir (67).

2.12.4. Ekstrapulmoner ve Yaygın Hastalık

Ekstrapulmoner ve yaygın enfeksiyonlar, daha agresif ve bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımları gerektirir. Bu enfeksiyonlar, genellikle çoklu organ tutulumu gibi ciddi olgularda amikasin gibi parenteral ajanların dahil edilmesini gerektirir. Yaygın hastalıklarda tam eradikasyonu sağlamak için 12 ayı aşan daha uzun tedavi süreleri sıklıkla gereklidir (51).

2.12.5. Destekleyici Tedaviler

Kortikosteroidler gibi destekleyici tedaviler, merkezi sinir sistemi veya perikardiyal tutulum gibi önemli inflamasyon veya doku hasarının görüldüğü durumlarda kullanılabilir. Ancak kortikosteroid kullanımı, özellikle HIV veya diğer immünosupresif durumlara sahip bireylerde immünosupresyon riski ile dikkatli bir şekilde dengelenmelidir (50).

2.12.6. HIV-Seropozitif Hastalarda Özel Hususlar

HIV-pozitif hastalarda *M. kansasii* enfeksiyonunun tedavisi, özel dikkate

alınması gereken durumlar içerir. Rifampin ile antiretroviral tedavi (ART) arasındaki ilaç etkileşimleri, özellikle proteaz inhibitörlerinde rifabutin kullanımını alternatif olarak gerekli kılar. Ayrıca, ART başlatıldığında bağışıklık yeniden yapılandırma inflamatuvar sendromu (IRIS) tedaviyi karmaşık hale getirebilir; bu durum dikkatli izlem ve yönetim gerektirir (EACS).

2.12.7. Cerrahi Müdahaleler

Uzun süreli tıbbi tedaviye rağmen kaviter hastalık veya apse gibi lokalize lezyonların devam ettiği nadir *M. kansasii* enfeksiyonu olgularında cerrahi rezeksiyon gerekebilir. Cerrahi girişimler genellikle odaklanmış hastalığa ve iyi pulmoner rezervlere sahip hastalar için kullanılmaktadır (68).

2.13. Sanger Dizileme: Prensipleri ve Mekanizması

1977 yılında Frederick Sanger tarafından geliştirilen Sanger dizileme yöntemi, DNA moleküllerinin nükleotit dizilimini belirlemek için zincir sonlandırma tekniklerini kullanan bir yöntemdir (69). Bu yöntem, moleküler biyolojide temel bir taş haline gelmiş ve İnsan Genom Projesi gibi bilimsel ilerlemelere önemli katkılarda bulunmuştur (70). Yüksek verimli yeni nesil dizileme (Next-Generation Sequencing; NGS) teknolojilerinin ortaya çıkmış olmasına rağmen, Sanger dizileme hâlâ güvenilirliği, doğruluğu ve uzun okuma uzunlukları üretebilme kapasitesi nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (71).

Sanger dizileme yöntemi, DNA sentezinin kontrollü bir şekilde sonlandırılmasına dayanmaktadır. Bu durum, 3'-hidroksil grubundan yoksun olan dideoksinükleotit trifosfatların (ddNTP'ler) kullanımıyla sağlanır. Bu modifiye edilmiş nükleotitler, DNA zincirinin uzamasını durdurur ve bu da farklı uzunluklarda DNA parçalarının oluşmasına yol açar (69). Sanger dizilemenin başlıca avantajları doğruluğu, basitliği ve uzun DNA parçalarını dizileme yeteneğidir. Ancak, düşük verimliliği ve yüksek maliyeti, bu yöntemin büyük ölçekli projelerde kullanımını sınırlamıştır (72). Ayrıca, PZR yöntemine olan bağımlılığı şablon çoğaltmada yanlışlıklar yaratabilir (73).

Sanger dizileme için ilk adım, tek iplikli bir DNA şablonunun hazırlanmasıdır. Bu DNA şablonu genellikle hedef bölgenin PZR ile çoğaltılması yoluyla elde edilir ve böylece yeterli miktar ve özgüllük sağlanır (73). Bu çoğaltılmış DNA, dizileme reaksiyonu için bir alt tabaka görevi görür. İkinci adım, reaksiyon karışımının hazırlanmasıdır. Sanger dizileme reaksiyonu, tek iplikli DNA şablonu, dizileme primeri, DNA polimeraz, deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP'ler), dideoksinükleotit trifosfatlar (ddNTP'ler) bileşenlerinden oluşmaktadır. Reaksiyon sırasında DNA polimeraz, şablon ipliğine tamamlayıcı dNTP'leri ekleyerek primeri uzatır. Ara sıra bir ddNTP, bir dNTP yerine eklenir. ddNTP'ler 3'-hidroksil grubundan yoksun olduğu için DNA zincirinin daha fazla uzaması engellenir. Bu durum, her biri bir ddNTP ile sonlanan farklı uzunluklarda DNA parçalarının oluşmasına neden olur (69). Dizileme reaksiyonu ile üretilen DNA parçaları, kapiler elektroforez kullanılarak uzunluklarına göre ayrılır.

Negatif yüklü DNA molekülleri, bir elektrik alan altında polimer dolgulu kapillerden geçerken kısa parçalar uzun olanlara göre daha hızlı hareket eder. Parçalar elektroforez sırasında lazer detektörden geçtiğinde, ddNTP'lere bağlı floresan boyalar spesifik dalga boylarında ışık yayar. Bu sinyaller kaydedilir ve bir kromatogram olarak çevrilir; her bir zirve bir nükleotidi temsil eder (Smith ve ark., 1986). Dizilim, floresan sinyallerin sırasına göre belirlenir. Modern yazılımlar, tespit edilen diziyi bir referans genoma veya şablona hizalayarak yorumlama ve kalite kontrolünü sağlar (71).

2.13.1. Sanger Dizilemenin Uygulamaları

Sanger dizileme, BRCA1 ve BRCA2 gibi genetik hastalıklarla ilişkili mutasyonların tanımlanmasında klinik ortamlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek doğruluğu, özellikle NGS ile tespit edilen varyantların doğrulanması için uygundur. Bu yöntem, patojenlerin tanımlanması ve antibiyotik direnci mekanizmalarının incelenmesi gibi mikrobiyal genom dizilemesinde kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır (74). NGS, baz çağırma hatalarına karşı hassas olduğundan, özellikle düşük karmaşıklıkta veya tekrar eden DNA bölgelerinde Sanger dizileme, kritik bulguların doğrulanması için kullanılır (75). CRISPR-Cas9 gibi gen düzenleme teknolojilerinde Sanger dizileme, hedef modifikasyonların doğrulanması ve

istenmeyen etkilerin tespiti için temel bir araçtır (76).

2.14. Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme (NGS), DNA ve RNA'nın yüksek verimli dizilenmesine olanak tanıyan, genomik araştırmalar, klinik tanı ve kişiselleştirilmiş tıpta devrim yaratan bir teknolojidir. Bu yöntem, geleneksel Sanger dizilemeye kıyasla benzeri görülmemiş bir hız, doğruluk ve maliyet etkinliği sağlayarak biyolojik sistemlerin daha derinlemesine anlaşılmasını mümkün kılmaktadır (77). NGS, tam genom dizileme, transkriptomik, metagenomik ve epigenomik dahil geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Klinik uygulamalarda genom düzeyinde kansere neden olan mutasyonların saptanması, nadir hastalık teşhisi ve patojen tespiti için kullanılarak kişiselleştirilmiş tıpta önemli ilerlemeler sağlamaktadır (78).

NGS için çeşitli platformlar geliştirilmiştir ve her biri farklı kimyasal yöntemler ve metodolojiler kullanmaktadır. Önde gelen platformlar arasında Illumina, Roche 454, Ion Torrent ve Pacific Biosciences (PacBio) gibi sistemler bulunmaktadır. Illumina platformları, yüksek doğruluk ve ölçeklenebilirlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Dizileme süreci, sentezle dizileme (SBS) yöntemine dayanır. DNA parçaları katı bir yüzeye immobilize edilir ve kümeler oluşturacak şekilde çoğaltılır. Sentez sırasında floresan işaretli nükleotitler birer birer eklenir ve yayılan floresan tespit edilerek kaydedilir. Bu yöntem, genom montajı ve transkriptomik gibi uygulamalar için ideal olan yüksek kaliteli kısa okuma dizileri üretmesiyle bilinir (79).

Roche 454 platformu, pirodizileme yöntemini kullanır; burada nükleotit eklenmesi sırasında salınan pirofosfat, lusiferaz varlığında bir ışık sinyalini tetikler. Bu yöntem, Illumina'ya kıyasla daha uzun okumalar üretir ancak özellikle homopolimerik bölgelerde daha yüksek hata oranlarına sahiptir. Bu platform artık büyük ölçüde kullanımdan kalkmış olsa da erken NGS geliştirme sürecinde önemli bir rol oynamıştır (80).

Ion Torrent dizileme, nükleotit eklenmesi sırasında salınan hidrojen iyonlarını tespit etmek için yarı iletken teknolojisini kullanır. Floresana dayalı sistemlerin aksine,

Ion Torrent pH değişimlerini doğrudan ölçer. Daha hızlı çalışma süreleri ve daha düşük maliyetler sunmasına rağmen, homopolimerik bölgelerdeki hata oranı bir sınırlama olabilir (81).

PacBio'nun tek moleküllu gerçek zamanlı (SMRT) dizileme teknolojisi, DNA polimeraz aktivitesini gerçek zamanlı olarak izleyerek uzun okuma dizileme sağlar. Bu platform, yapısal varyasyonların, tekrarlayan bölgelerin ve tam uzunlukta transkript dizilemesinin çözülmesinde son derece avantajlıdır; ancak, kısa okuma platformlarına kıyasla daha düşük verimlilik ve daha yüksek maliyetlere sahiptir (82). Oxford Nanopore Technologies (ONT) platformları, bir membrana gömülü nanoporlar kullanır. Tek zincirli DNA veya RNA molekülleri nanopordan geçerken elektrik akımındaki değişiklikler ölçülerek bazlar tanımlanır. ONT, ultra uzun okumalar, taşınabilirlik ve gerçek zamanlı veri analizi sunarak saha uygulamaları ve de novo genom montajı için uygun hale gelmektedir (83).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. *M. kansasii* İzolatları

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Tüberküloz Birimi, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (HSGM) Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda izole edilen 40 *M. kansasii* izolatı ile yapılmıştır. HSGM'de, Tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) tür tayını yapılarak *M. kansasii* izolatları tanımlanmıştır. Bu çalışmada 'Clinical and Laboratory Standards Institute' (CLSI) M24S-Ed2 kılavuzu kullanılarak *M. kansasii* 'American Type Culture Collection' ATCC 12478 suşu, antimikrobiyal duyarlılık kontrol suşu olarak kullanılmıştır (84).

3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

Kullanılan malzemeler:

Etanol (%95)

Distile su

Löwenstein Jensen besiyeri

Tüp sporu

Tek kanallı mikropipet

Çok kanallı mikropipet

Pipet uçları

Standart U tabanlı 96 kuyucuklu plak

Standard düz tabanlı 96 kuyucuklu plak

Otoklav

Santrifüj tüpü

Santrifüj cihazı

Etüv

Hassas terazi

Sınıf 2 biyogüvenlik kabini

Vorteks

+4°C buzdolabı
-20°C derin dondurucu
-80°C derin dondurucu
Antibiyogram sonuçlarını okumak için konkav ayna ve büyüteç
Spektrofotometre cihazı
Eldiven
Isı bloğu
Metilen mavisi
'Sensititre® Cation-Adjusted Mueller Hinton OADC' (MH-OADC) tüpü
'Sensititre® Dosing Head' kapağı
'Sensititre® AIM Automated Inoculator' cihazı
FluoroLyse (Hain Lifescience, Nehren, Germany) kiti
Santrifüj cihazı
Taq premiks 2x
Termal döngü cihazı
UltraPure 10X TBE tampon
Agaroz RA
'Ultra GelRed' boyası
Moleküler ağırlık standardı (DNA ladder)
'BioRad ChemiDoc' görüntüleme cihazı
'KAPA Pure Beads' DNA Pürifikasyon kiti
Manyetik ayırıştırma rafı (magnetic rack)
Nükleaz içermeyen su (Nuclease-free water)
'Qubit™ Flex' Fluorometresi
'Qubit™ dsDNA HS Assay' kiti
ABI 3500 Sanger dizileme cihazı
'BrilliantDye™ Terminator (v3.1) Cycle Sequencing' kiti
'Mag-Bind® SeqDTR Purification' kiti
'MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate'
Septa
'Native Barcoding Kit' 96 V14 (SQK-NBD114.96)
'Oxford Nanopore Technologies' (ONT) dizileme cihazı

3.3. *M. kansasii* İzolatlarının Löwenstein-Jensen Besiyerinde Üretilmesi

Bu çalışmada, *M. kansasii* izolatları -20°C derin dondurucudan çıkartıldıktan sonra oda sıcaklığında steril koşullarda çözündürülmüştür. Bu işlem, laboratuvar biyogüvenliği protokollerine uygun olarak ve kişisel koruyucu ekipmanlar (eldiven, önlük, N95 maske) kullanılarak, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (HSGM) Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda Sınıf 2 biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. 100 µl'lik bir bakteri çözeltisi Löwenstein-Jensen besiyerine inoküle edilmiş ve besiyeri tüpleri, kapakları tam sıkılmadan yatay şekilde spor içinde yaklaşık 5 gün boyunca 37°C sıcaklıkta etüvde inkübe edilmiştir. Besiyerlerinin düzenli olarak üreme ve kontaminasyon kontrolleri yapılmış ve 5'inci günün sonunda kapakları kapatılıp yaklaşık 25 gün üreme için bekletilmiştir (85).

3.4. *M. kansasii* İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testi, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) rehberi ve üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiş ve yorumlanmıştır. Sensititre® SLOMYCO (TREK Diagnostic Systems, West Sussex, İngiltere), mikobakteri türlerinin antimikrobiyal duyarlılık testi (AST) için tasarlanmış ticari bir sistemdir ve antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonunu (MİK) değerlendirmek için 'Broth' mikrodilüsyon yöntemini kullanır. SLOMYCO paneli (yavaş üreyen mikobakteri türleri için) 13 antimikrobiyal ilaç ve bir pozitif kontrol içerir ancak CLSI M24S-Ed2 rehberine göre amikasin, rifampin, siprofloksasin, doksisisiklin, moksifloksasin, linezolid, rifabutin, klaritromisin, trimetoprim-sülfametoksazolün duyarlılık sonucu değerlendirilmiştir. Sensititre SLOMYCO panelinde minosiklin bulunmadığı için minosiklinin duyarlılık testi yapılamamıştır.

M. kansasii Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiştir. Sonra, demineralize su tüpü kullanılarak bakteri kolonisinin bir süspansiyonu hazırlanmıştır. 2-3 bakteri kolonisi 1 mL demineralize su tüpüne eklenmiş ve homojen bir süspansiyon oluşturmak için iyice karıştırılmıştır. Süspansiyon 'Sensititre Nephelometer' cihazında McFarland 0,5 standardına ayarlanmıştır. Daha sonra 'Sensititre® Cation-Adjusted Mueller Hinton

OADC' (MH-OADC) tüpüne hazırlanan süspansiyondan eklenmiş ve tüpün başına özel 'Sensititre® Dosing Head' kapağı takıldıktan sonra bu tüp 'Sensititre® AIM Automated Inoculator' cihazına takılmıştır. 'Sensititre® AIM' cihazı, Sensititre® MİK plakalarına uygun hacimde mikrobiyal süspansiyonu otomatik olarak dağıtmak üzere tasarlanmıştır. Sensititre SLOMYCO plakaları, 7-14 günlük inkübasyondan sonra yeterli üreme gösterene kadar 37°C'de inkübe edilmiştir. *M. kansasii* için okumalar konkav bir ayna kullanılarak değerlendirilmiş ve üreme olmayan kuyucuklar minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) olarak kabul edilmiştir. *M. kansasii* suşu ATCC 12478, MİK testi için referans suş olarak kullanılmıştır (86).



Şekil 3.1. 'Sensititre SLOMYCO' plakaları (TREK Diagnostic Systems, Birleşik Krallık).

3.5. DNA İzolasyonu

40 *M. kansasii* izolatının DNA izolasyonu için FluoroLyse (Hain Lifescience, Nehren, Germany) kiti kullanılmıştır. Bu amaçla DNA izolasyonun ilk aşamasında, 300 µl FluoroLyse bir mikrosantrifüj tüpüne eklenmiştir. Löwenstein-Jensen besiyerinden 2-3 koloni transfer edilip vorteks uyguladıktan sonra tüp 95°C'de 5 dakika kaynatılmıştır. Ardından kısa bir spinden sonra, tüpe 100 µl nötralizasyon tamponu (F-NB) eklenmiş ve karışım 5 saniye vorteksleme ardından 13000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak, kalan üst sıvı mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen DNA, Sanger dizilemenin PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere ayrılmıştır.



Şekil 3.2. FluoroLyse kiti (Hain Lifescience, Nehren, Germany)

3.6. *gyrA*, *gyrB* ve *rrl* gen bölgelerinin PZR ile Çoğaltılması

Bu çalışmada, *M. kansasii* izolatlarında CLR, CIP antimikrobiyal ilaç hedeflerinin çoğaltılması için Tablo 1'de verilen primerler kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir. 30 µL reaksiyon karışımı için 15 µL Taq premiks 2x (Genet Bio Inc), 10 pmol ileri ve ters primerlerin her birinden 1,5 µl ve hazırlanmış 12 µl genomik DNA kullanılmıştır (Tablo 1). *gyrA*, *gyrB* ve *rrl* amplifikasyonu 'Labcyler Basic' (SensoQuest GmbH) termal döngü cihazında yapılmıştır: *gyrA*, *gyrB*, *rrl* için ilk denatürasyon 95°C'de, 5 dk; ardından 30 saniye 95°C'de denatürasyon, 30 saniye 60°C primer bağlanması ve 72°C'de 90 saniye uzatma 35 döngü olacak şekilde tekrarlanmış, ve son uzatma 72°C'de 5 dk yapılmıştır.

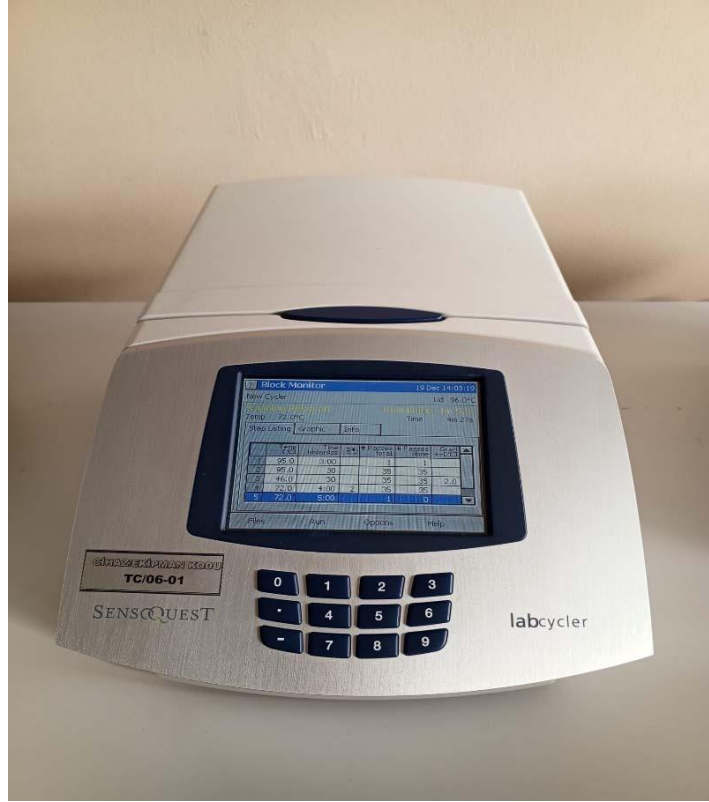
Tablo 3.1. *gyrA*, *gyrB* ve *rrl* genlerin çoğaltılması için kullanılan primerler

Gen	Primerler	Uzunluk
<i>gyrA</i>	F: ATTCTGCCGAACGGATCGAG R: CGACCGCGTTATCCGAATTG	459 bp
<i>gyrB</i>	F: TGGGCAACACCGAGGTGAAG R: ACGGGTCCATGGTGGTTTCC	762 bp
<i>rrl</i>	F: CCAGGTCTGGCCTATCGAAC R: CGGGATTCCGGTCGCAGAAAC	1110 bp

Tablo 3.2. PZR bileşenleri

Bileşen	Miktar
Taq Premiks 2x	15 µL
F (İleri) Primer	1,5 µl
R (Ters) Primer	1,5 µl
Örnek (DNA)	12 µl

**Şekil 3.3.** Taq premiks 2x (Genet Bio Inc)

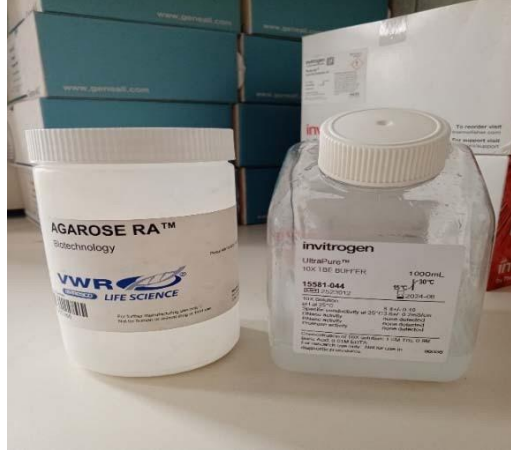


Şekil 3.4. 'Labcyler Basic' (SensoQuest GmbH) termal döngü cihazı

3.7. Agaroz Jel Elektrofrezinin Uygulanması

Agaroz jel elektrofrezini, DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin ayrılması ve analiz edilmesi için moleküler biyoloji ve biyoteknolojide yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, nükleik asitlerin büyüklüklerine, bütünlüklerine ve miktarlarına göre ayrılmasını, görselleştirilmesini ve analiz edilmesini sağlar. Bu çalışmada amplicon boyutlarına göre %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bu amaçla, agaroz jel elektrofrez hazırlama kalıplarının kenarları özel lastikli aparatlar ile kapatılmıştır. Ardından taraklar yükleme kuyucuklarının oluşturulması için takılmıştır. 950 ml distile suya 50 ml UltraPure 10X TBE tamponu eklenmiştir. 200 ml hazırlanan solüsyondan alınıp üzerine 2 gr agaroz RA (VWR Life Science) eklenmiştir. Daha sonra, agaroz eriyene kadar mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Jel soğutulurken, 20 µL Ultra GelRed (87) boyası (Vazyme, Nanjing, China) eklenmiştir. Daha sonra, karıştırılarak jel elektrofrez hazırlama kalıbına dökülmüştür. Jel katılaştıktan sonra elektrofrezin gerçekleşeceği tanka yerleştirilmiştir. Ardından, jelin üzerine önceden hazırlanan 10X TBE solüsyonundan eklenmiştir. Birinci kuyucuğa 1kb plus (Thermo Scientific) moleküler ağırlık standardı (DNA ladder) ve ardından diğer kuyucuklara

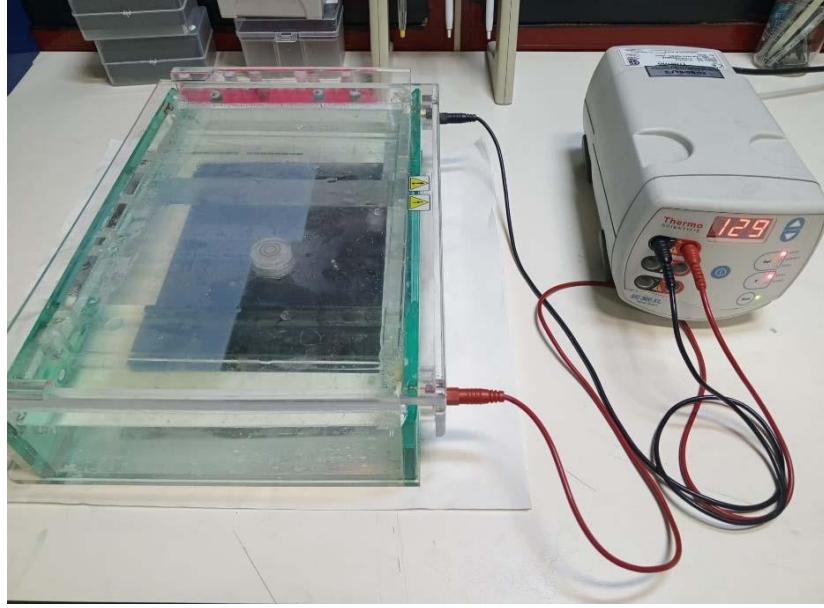
doğrudan (master miks boyalı) 5 µl örnek yüklenmiş ve 120 V akımda ortalama 90 dk yürütülerek UV ışığında 'BioRad ChemiDoc MP Imaging System' (Universal Hood III, USA) cihazında görüntülenmiştir.



Şekil 3.5. UltraPure tampon ve agaroz RA



Şekil 3.6. Ultra GelRed



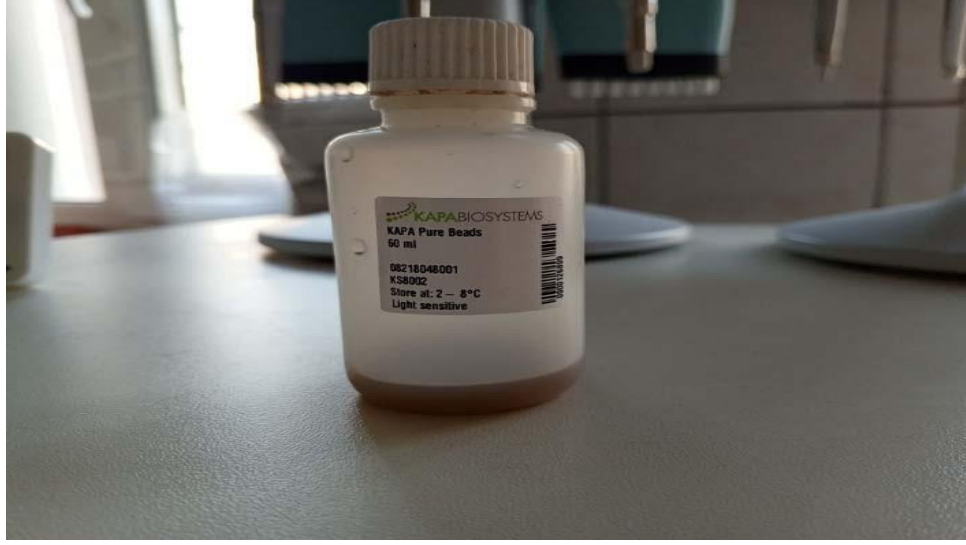
Şekil 3.7. Jel elektroforez ekipmanı



Şekil 3.8. 'BioRad ChemiDoc MP Imaging System' (Universal Hood III, USA) cihazı

3.8. PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Bu çalışmada, *gyrA*, *gyrB* ve *rrl* PZR ürünlerinin pürifikasyonu için 'KAPA Pure Beads' DNA pürifikasyon kiti (Roche) kullanılmıştır. 'Kapa Pure' boncukları, spesifik olarak nükleik asitlere bağlanarak proteinler ve tuzlar gibi kontaminantların uzaklaştırmasına olanak tanıyan bir DNA saflaştırma kitidir. İlk basamakta saflaştırma için 96'lı plak kuyucuklarına PZR ürünlerinden 20 µl ve 'Kapa bead'ten 36 µl aktarılıp 5 kez pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 6 dk inkübasyondan sonra plak özel manyetik ayrıştırma rafı (magnetic rack) üzerinde 6 dk inkübe edilmiştir. Boncuklara zarar vermeden 200'lük pipet ile üstte kalan sıvı atılmıştır. İlk yıkamada 200 µl %70 etanol eklenmiş ve 30 sn oda sıcaklığında bekletildikten sonra süpernatant kısım atılmıştır. İkinci yıkama da birinci basamakta olduğu gibi tekrar edilmiştir. Daha sonra, plak manyetik rak üzerinden alınıp oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Bu şekilde kalan alkolün kuruması sağlanmıştır. Her kuyucuğa 35 µl nükleaz içermeyen su (Nuclease-free water) eklenip iyice pipetaj yapıldıktan sonra tekrar 2 dk manyetik ayrıştırma rafında inkübe edilip şeffaf olana kadar bekletilmiştir. Son aşamada, örnek sayısı kadar 1,5 ml'lik tüplerin üzerine örnek numaraları yazılmış ve 30 µl çözelti her kuyucuktan alınıp yeni tüplere aktarılarak Sanger dizileme yapılana kadar -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.9. 'KAPA Pure Beads'



Şekil 3.10. Manyetik ayırma rakı (magnetic rack)



Şekil 3.11. Manyetik ayırıştırma rakı (magnetic rack)

3.9. DNA Miktar Tayini

Bu çalışmada, ‘Qubit™ Flex’ fluorometresi ve ‘Qubit™ dsDNA HS Assay’ kiti kullanılarak DNA konsantrasyonu ölçülmüştür. Qubit fluorometresi, floresan temelli bir ölçüm yöntemi sunarak düşük konsantrasyonlu örnekler için yüksek hassasiyet ve doğruluk sağlar. Aşağıda, ‘Qubit Flex’ Fluorometresi ile DNA konsantrasyonunun ölçülmesi için izlenen adımlar detaylandırılmaktadır. ‘Qubit™ dsDNA HS Assay’ kitinde bulunan DNA standart çözeltileri, fluorometre için kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılır. Bu amaçla, 40 örnek, 8 standart 1 ve 8 standart 2 için toplamda 56 örnek için çözelti hazırlanmıştır. Çözelti için 11,144 μl Qubit™ tamponu üzerine 56 μl ‘Qubit™ dsDNA HS Reagent’ (floresan boya) eklenip vorteks uygulanmıştır. Daha sonra, standartlar için her Qubit tüpüne 190 μl çözeltilerden aktarılıp üzerine 10 μl standart 1 ve standart 2 eklenmiştir. Ardından, vorteks ve spin uygulanarak 2 dk inkübe edilip cihaza kalibrasyon için yerleştirilmiştir. Örneklerin konsantrasyon ölçümü için çözeltilerden 199 μl Qubit tüpüne aktarılıp üzerine 1 μl örnek

eklenip vorteks ve spin yapılmıştır. İki dakikalık inkübasyon sonrasında cihazda ‘Qubit™ dsDNA HS Assay’ seçilerek ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar ng/ μ L cinsinden kaydedilmiştir.




Şekil 3.12. ‘Qubit™ dsDNA HS Assay’ kiti




Şekil 3.13. Qubit™ Flex ve Qubit™ 4 Fluorometresi

1 Before You Begin



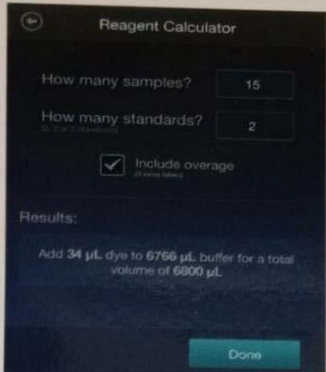
Select **Calculators** from the Qubit Flex home screen.

These two calculators will help you prepare your assays.



Use the **Assay Range Calculator** to show how the assay range changes based on the sample volume used (1-20 µL). Tap ⓘ to view range details.

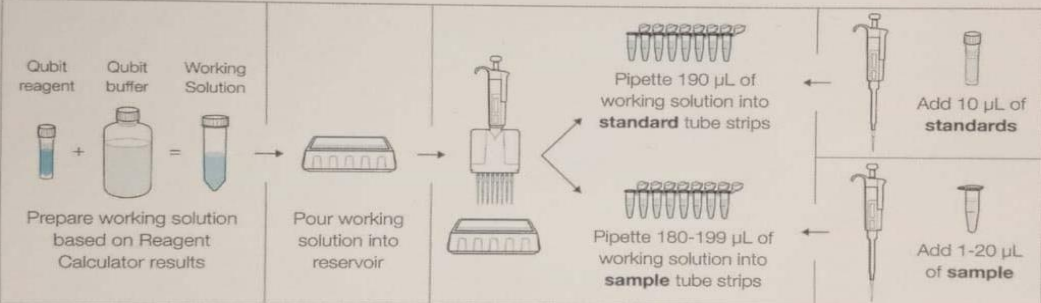
Core range = High accuracy
Extended range = Moderate accuracy



Use the **Reagent Calculator** to determine the amount of working solution to prepare.

One sample = One tube of the tube strip
One standard = All 8 tubes of the tube strip
Overage = 3 extra tubes

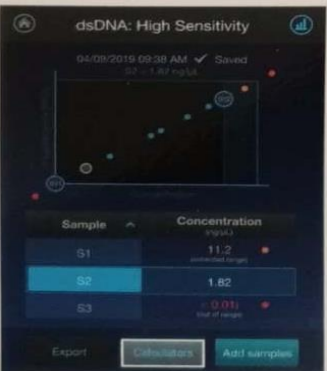
2 Prepare the Assay



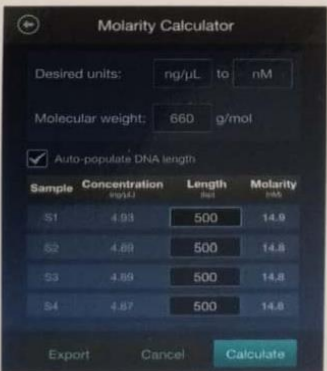
Vortex all tubes for 2-3 seconds, check for bubbles, then incubate for 2 minutes (15 minutes for protein) at room temperature

3 Read Standards & Run Samples

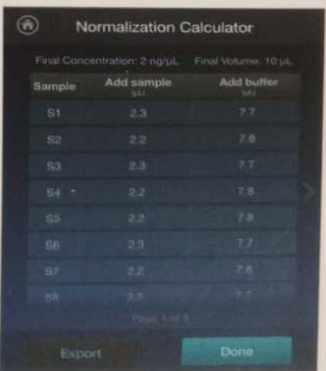
4 Analyze the Results



Open circles on graph = Standards
Blue = Samples in core range
Orange = Samples in extended range
Red = Samples outside of range



Use the **Molarity Calculator** to convert values to molarity based on nucleic acid length.



Use the **Normalization Calculator** to determine how to dilute the samples to the same concentration.

Şekil 3.14. Qubit™ Flex ile DNA konsantrasyon ölçümü

3.10. Sanger Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing)

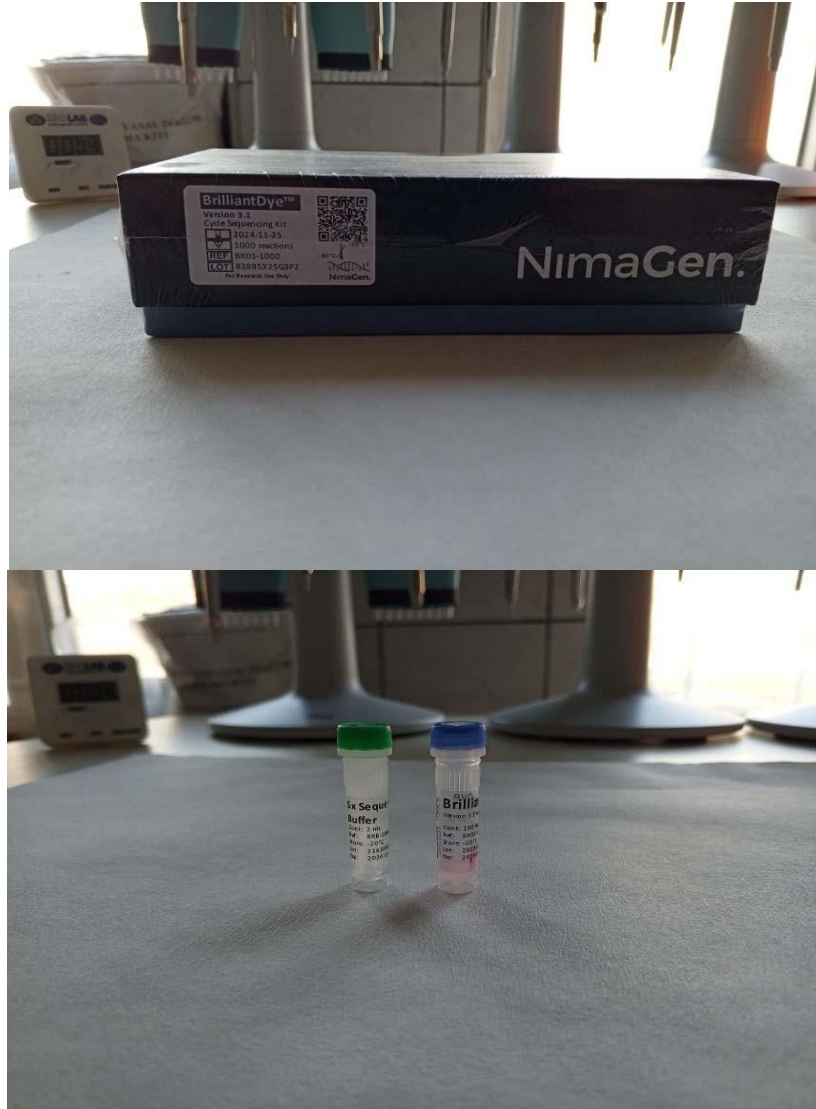
Bu çalışmada, *gyrA*, *gyrB* ve *rrel* gen bölgelerinin dizilemesi için “ABI 3500” Sanger dizileme cihazı (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) ve “*BrilliantDye™ Terminator (v3.1) Cycle Sequencing Kit (NimaGen, Netherlands)*” dizileme kiti kullanılmıştır. Bu amaçla, her gen bölgesi için ileri ve ters primerler olarak ayrı ayrı 1,5’lük tüpte toplu şekilde karışım hazırlanmıştır. Daha sonra, 8 µL karışımdan 0.2 ml’lik PZR tüpüne aktarılmıştır. 2 µL amplifikasyon ürünü eklendikten sonra pipetaj yapılmış ve ardından spin uygulanmıştır. Tüpler son olarak, termal döngü cihazına (*SensoQuest GmbH*) yerleştirilmiştir. Bu karışımın hazırlanmasında kullanılan bileşenlerin miktarları Tablo 2’de yer almakta olup, termal döngü reaksiyonunun programı ise Tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Dizileme reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar
BrilliantDye Terminator	1 µL
5x sequencing buffer	1,5 µL
Primer (F veya R)	0,5 µL (10 pmol)
NFW	5 µL
DNA (amplifikasyon ürünü)	2 µL
Reaksiyon Hacmi (Toplam)	10 µL

Tablo 3.4. Sanger dizileme aşamasında uygulanan PZR döngü koşulları

Döngü Basamağı	Sıcaklık	Süre	30 döngü
İlk Denatürasyon	96°C	1 dk	
Denatürasyon	96°C	10 sn	
Bağlanma	50°C	5 sn	
Uzama	60°C	4 dk	

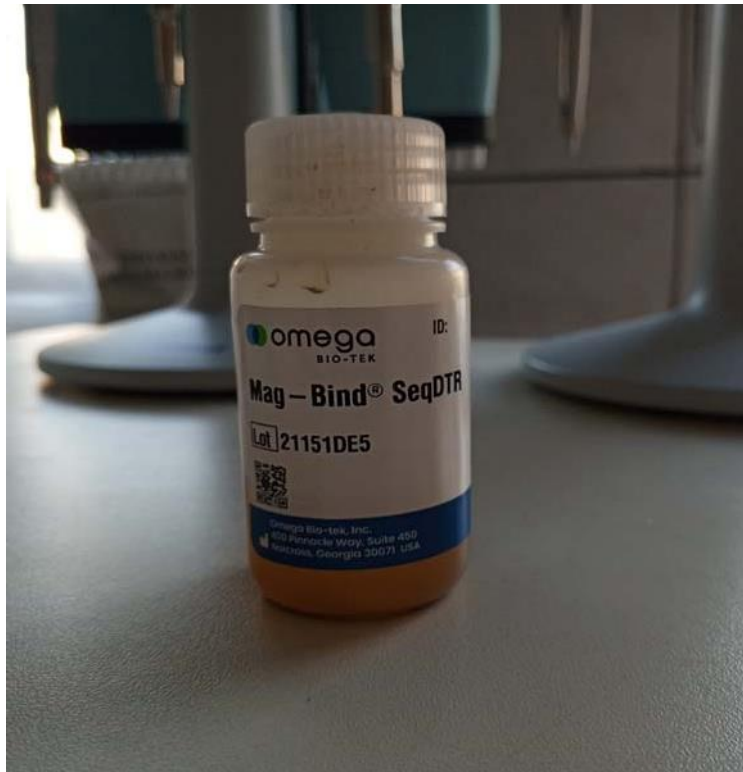


Şekil 3.15. 'BrilliantDye™ Terminator (v3.1) Cycle Sequencing' kiti

3.11. Cycleseq Pürifikasyon

Boya terminatörleri, dizileme sürecinde kullanılan floresan etiketli nükleotitlerdir. 'Mag-Bind® SeqDTR Purification Kit' Sanger dizileme reaksiyonlarından boya terminatörlerini ve diğer kontaminantları temizlemek için özel olarak tasarlanmıştır. Bu çalışmada, cycle sekansdan sonra elde edilen 10 μ L ürüne, 10 μ L 'Mag-Bind® SeqDTR' ve 41 μ L %85'lik etanol eklenmiştir. 5 kere pipetajdan sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra, 5 dk manyetik rak üzerinde bekletilmiştir. Boncuklara zarar vermeden nazikçe 100'lük pipetle sıvı alınmış ve 100 μ L %85'lik etanol eklenmiştir. 30 sn sonra kuyucuklarda olan etanol atılıp tekrar 100

μL %85'lik etanol yıkama yapılmıştır. 30 sn sonra kuyucuklarda olan etanol atılmış ve plak rak üzerinden alınıp 5 dk oda sıcaklığında kalan etanolün kuruması için bekletilmiştir. Daha sonra, 40 μL NFW ekleyip pipetaj yapıldıktan sonra 3 dk manyetik rak üzerinde bekletilmiştir. Her kuyucuktan 35 μL saf üründen alınıp Sanger cihazına yüklemek için 'MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate'e (Applied Biosystems) aktarılmıştır. Son basamakta, plak septa ile kapatılmış ve cihaza yüklenmiştir.



Şekil 3.16. 'Mag-Bind® SeqDTR Purification' kiti



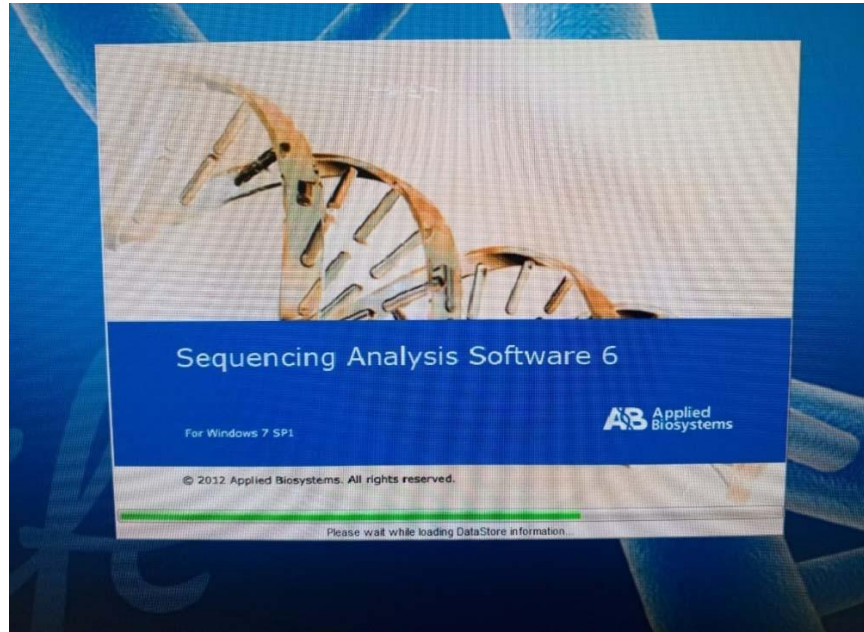
Şekil 3.17. ‘MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate’ ve Septa



Şekil 3.18. “ABI 3500” Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.12. Sanger Dizileme Aşaması

'MicroAmp Optical' 96-kuyucuklu reaksiyon plağı (Applied Biosystems) cihaza yüklendikten sonra '3500 Series Data Collection' yazılımı ve 'Std-Seq-Assay-POP7' kullanılarak dizileme süreci başlatılmıştır. Yaklaşık 8 saatlik dizileme sürecinin sonunda 'Sequencing Analysis Software 6' programı kullanılarak kromatogram görüntüsü ve çalışmanın kalitesi analiz edilmiştir. Dizileme sonuçları FASTA formatı olarak alınmıştır. 'SeqTrace 0.9.0' programı kullanılarak ileri ve ters diziler birleştirilmiştir. Ardından, NCBI'de blast işlemi yapılarak elde edilen dizilerin hedef gene (*gyrA*, *gyrB* ve *rrl*) ait olup olmadığının kontrolü sağlanmıştır. Daha sonra, her gen bölgesi için referans genom indirilmiş ve "MEGA versiyon 11" programı kullanılarak hizalama işlemi ile gen bölgelerinde mutasyonların olup olmadığı ve amino asit değişimleri incelenmiştir.



Şekil 3.19. 'MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate' ve Septa

3.13. Hedefe Yönelik Yeni Nesil Dizileme

Bu çalışmada, *ropB* ve *rpbA* gen bölgelerinin dizilenmesi için Hedefe Yönelik Dizileme (Targeted Sequencing) yöntemi tercih edilmiştir. Hedefe Yönelik Dizileme, belirli gen bölgelerini, genetik varyantları veya çalışılan hedefleri analiz etmek amacıyla kullanılan bir genomik yöntemdir. Bu yöntem, genomun tamamını dizilemek yerine yalnızca spesifik bir bölgenin hedef alınmasını sağlar. Çalışmada bu amaç doğrultusunda, Oxford Nanopore Technologies (ONT) tarafından geliştirilen ve amplikonların ligasyon bazlı dizilenmesi için tasarlanmış bir ürün olan ‘Native Barcoding Kit 96 V14’ (SQK-NBD114.96) kullanılmıştır. Dizileme işlemleri, Oxford Nanopore cihazlarında DNA amplikonlarını hazırlamak üzere tasarlanmış ‘Ligation Sequencing Amplicons- Native Barcoding Kit 96 V14’ (SQK-NBD114.96) protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu protokol, barkodlama, barkodlanmış numunelerin havuzlanması, adaptör ligasyonu ve dizileme için kütüphane hazırlama gibi temel adımları içermektedir.



Şekil 3.20. 'Native Barcoding Kit 96 V14' (SQK-NBD114.96)

3.14. DNA Miktar Tayini

Bu çalışmada, 'Qubit™ Flex' fluorometresi ve 'Qubit™ dsDNA HS Assay' kiti kullanılarak DNA konsantrasyonu ölçülmüştür. Çalışma basamakları bölüm 3.9'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.15. *ropB* ve *RbpA* gen bölgelerinin PZR ile Çoğaltılması

rpoB, bakterilerde RNA polimeraz enziminin β -alt birimini kodlayan kritik bir genidir. *rpoB* genindeki mutasyonlar, özellikle rifampin (rifampisin) gibi antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde birincil mekanizma olarak tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar, RNA polimerazın β -alt birimindeki rifampin bağlanma bölgesini değiştirerek ilacın etkinliğini azaltır ve böylece rifampin tedavisinin başarısını önemli ölçüde etkiler. *RbpA* (RNA polimeraz bağlayıcı protein A), RNA polimeraz enzimini stabilize eden ve transkripsiyonel aktiviteyi özellikle stres koşullarında artıran bir düzenleyici proteindir. *M. tuberculosis*'te, *rbpA*'nın rifampin direnç mekanizmalarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. *RbpA*, RNA polimerazın rifampinle etkileşimini modüle edebilir ve bu, bakterinin rifampin tedavisine karşı toleransını artırabilir. Bu çalışmada, *M. kansasii* suşlarında *rpoB* ve *rbpA* gen bölgelerinin çoğaltılması için Tablo 1'de açıklanan primerler kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir.

20 μ L reaksiyon karışımı için 10 μ L 'Phantamax 2x' (Vazyme), 10 pmol ileri ve ters primerlerin her birinden 1 μ L ve izole edilmiş 8 μ L genomik DNA kullanılmıştır (Tablo 1). *ropB* ve *rbpA* amplifikasyonu 'Labcycler Basic' (SensoQuest GmbH) termal döngü cihazında yapılmıştır: *ropB* için ilk denatürasyon 95°C'de, 3 dk; ardından 30 saniye 95°C'de denatürasyon, 30 saniye 48°C primer bağlanması ve 72°C'de 4 dk uzatma 35 döngü olacak şekilde tekrarlanmış ve son uzatma 72°C'de 5 dk yapılmıştır. *RbpA* amplifikasyonu için ilk denatürasyon 95°C'de 3 dk; ardından 30 saniye boyunca 95°C'de denatürasyon, 30 saniye boyunca 54°C'de primer bağlanması ve 72°C'de 60 saniye uzatma 35 döngü olacak şekilde tekrarlanmış ve son uzatma 72°C'de 5 dk yapılmıştır.

Tablo 3.5. PZR bileşenleri

Bileşen	Miktar
Taq premiks 2x	10 µL
F (İleri) Primer	1 µl
R (Ters) Primer	1 µl
Örnek (DNA)	8 µl

Tablo 3.6. *ropB* çoğaltmasında PZR döngü koşulları

Döngü Basamağı	Sıcaklık	Süre	35 döngü
Başlangıç Denatürasyon	95°C	3 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	48°C	30 sn	
Uzama	72°C	4 dk	
Son Uzama	72°C	5 dk	
Sonlandırma	4°C	∞	

Tablo 3.7. *rbpA* çoğaltmasında PZR döngü koşulları

Döngü Basamağı	Sıcaklık	Süre	35 döngü
Başlangıç Denatürasyon	95°C	3 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	54°C	30 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	5 dk	
Sonlandırma	4°C	∞	

3.16. Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulanması

Bu çalışmada ampikon boyutlarına göre %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bu amaçla, agaroz jel elektroforez hazırlama kalıplarının kenarları özel lastikli aparatlar ile kapatılmıştır. Ardından taraklar yükleme kuyucuklarının oluşturulması için takılmıştır. 950 ml distile suya 50 ml UltraPure 10X TBE tamponu eklenmiştir. 200 ml hazırlanan solüsyondan alınıp üzerine 2 gr agaroz RA (VWR Life Science) eklenmiştir.

Daha sonra, agaroz eriyene kadar mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Jel soğutulurken, 20 µL Ultra GelRed boyası (Vazyme, Nanjing, China) eklenmiştir. Daha sonra, karıştırılarak jel elektroforez hazırlama kalıbına jel dökülmüştür. Jel katılaştıktan sonra elektroforezin gerçekleşeceği tanka yerleştirilmiştir. Ardından, jelin üzerine önceden hazırlanan 10X TBE solüsyonundan eklenmiştir. Birinci kuyucuğa 1kb plus (Thermo Scientific) moleküler ağırlık standardı (DNA ladder) ve ardından diğer kuyucuklara doğrudan 5 µl örnek yüklenmiş ve 120 V akımda ortalama 90 dk yürütüldükten sonra UV ışığında 'BioRad ChemiDoc MP Imaging System' (Universal Hood III, USA) cihazında görüntülenmiştir [150].

3.17. GridION kütüphanesinin hazırlanması

36 rifampin dirençli *M. kansasii* izolatının rpoB ve rbpA PZR ampikonlarının DNA konsantrasyonu 1X dsDNA HS kiti (Invitrogen, ABD) ile 'Qubit Flex' florometresi kullanılarak ölçülmüştür. ONT ampikon dizileme kütüphanesi hazırlama protokolüne (SQK-NBD114.96) göre, her bir örneğin DNA konsantrasyonu 200 fmol'e (1 kb ampikonlar için 130 ng) ayarlanmıştır. Daha sonra, her bir örnek nükleaz içermeyen su kullanılarak 11,5 µL'lik son hacme tamamlanmıştır. Plaklara her bir örnek için 3,5 µL 'end-prep' reaktifleri ana karışımı (1 µL DNA kontrol örneği (DCS), 1,75 µL 'Ultra II End-prep' reaksiyon tamponu, 0,75 µL 'Ultra II' enzim miksi eklenmiştir. İnkübasyondan sonra, yeni bir 96 kuyucuklu plağa 1,25 µl 'Native Barcode' (NB01-96), 5 µl 'Blunt/TA Ligaz Master Mix' ve 3 µl nükleaz içermeyen su, 0,75 µl 'End-prepped DNA' eklenmiştir. İnkübasyondan 20 dakika sonra, her kuyucuğa 1 µl EDTA eklenmiş ve ardından 36 adet barkodlu örnek 1,5 ml'lik bir tüpe toplanarak saflaştırma, 'AMPure XP' boncukları (AXP) kullanılarak

gerçekleştirilmiştir.

Adaptör ligasyon aşaması reaksiyon karışımı için, 0,2 PZR tüpünde, önceki adımdan 30 µl elüsyon sıvısı, 5 µl nativ adaptör (NA), 50 µl 10X ligaz tamponu ve 5 µl T4 DNA ligaz (Vazyme-C301-01 40.000 U) pipet karışımları yapılarak hazırlanmıştır. 37°C'de 10 dakika inkübasyondan sonra, yıkamak için %80 etanol yerine 'Kısa Parça Tamponu' (SFB) ve 'AMPure XP' boncukları (Beckman Coulter, ABD) kullanılarak bir 'clean-up' adımı gerçekleştirilmiştir.

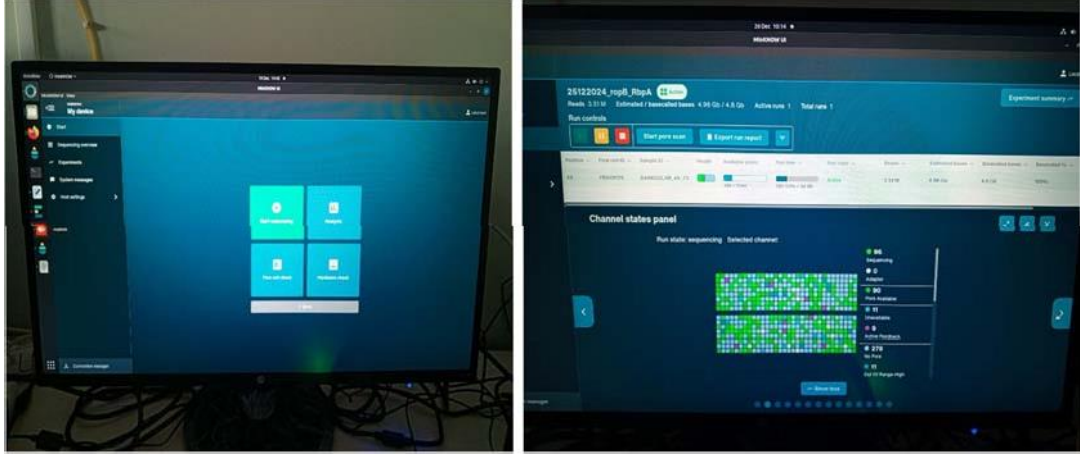
DNA fragman boyutuna göre, yeni bir 1,5 ml tüpte, DNA 12 µl 50 fmol elüsyon sıvısı, 37,5 µl 'Dizileme Tamponu' (SB) ve 25,5 µl 'Kütüphane Boncukları' (LIB) karıştırılmış ve 1352 pore sayısına sahip R10.4.1 akış hücresine yüklenmiştir. Amplikon dizilemesi ONT dizileme cihazında (GridION) gerçekleştirilmiş ve çalışma 20 saat sonra durdurulmuştur. ONT protokolüne göre 'Akış Hücresi Yıkama Kiti' (EXP-WSH002) kullanılarak yıkanmıştır.



Şekil 3.21. 'SpotON Flow cell'



Şekil 3.22. 'GridION cihazı'



Şekil 3.23. Minknow Uygulaması

3.18. Nanopore Amplikon Dizileme Veri Analizi

Dizilemenin ardından, POD5 formatında elde edilen sonuçlar hem baz çağırma hem de de-multipleksleme gerçekleştiren Dorado yazılımının en son sürümü kullanılarak FASTQ formatına dönüştürülmüştür. Barkod ve adaptör dizileri Dorado kullanılarak kaldırılmıştır ve düşük kaliteli bazlar 'Trimmomatic' (v0.39) ile temizlenmiştir. Her okumanın ilk 15 bazı daha düşük kalite nedeniyle kırpılmıştır; kalite puanı 20'nin altında olan okumalar analizden çıkarılmıştır. İşlenen okumalar daha sonra 'Geneious Prime' yazılımındaki (v23.2.2) 'minimap2' aracı kullanılarak *M. kansasii* referans genleri *rpbA* ve *rpoB* ile hizalanmıştır. Varyantlar 'Geneious Prime'daki "Varyasyonları ve SNP'leri Bul" aracı kullanılarak tanımlanıp ve rapor edilmiştir.

3.19. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Analizler SPSS (Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi) sürüm 23 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler, çeyreklik aralıklı medyanlar (IQR) olarak sunulurken, kategorik değişkenler için olanlar frekans (n) ve yüzde (%) olarak sunulmuştur. İki değişkenli analiz için, dokuz antimikrobiyal ajanın MİK90 değerleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren Pearson korelasyon katsayıları (R) hesaplanmıştır. Korelasyonun gücü aşağıdaki yorum kullanılarak değerlendirilmiştir: 0,00–0,19: çok zayıf; 0,20–0,39: zayıf; 0,40–0,59: orta; 0,60–0,79: güçlü; 0,80–1,0: çok güçlü. <0,05'lik bir p değeri istatistiksel olarak anlamlı bir seviye olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. İlaç Duyarlılık Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışmaya 2021, 2022 ve 2023 yıllarında izole edilmiş olan 40 adet *M. kansasii* izolatı dahil edilmiştir. *M. kansasii* için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) sınır değerleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından M24S-Ed2 rehberinde belirtilmiş ve *M. kansasii* için duyarlılık testlerinde standart yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi önerilmiştir.

Tablo 4.2., 4.3., 4.4. ve 4.5, *M. kansasii* izolatlarının dokuz farklı ajana karşı duyarlılık test sonuçlarını göstermektedir. CLSI (M24S-Ed2) rehberinde belirtilen sınır değerler dikkate alındığında, 40 *M. kansasii* izolatının tamamının klaritromisin (CLR), amikasin (AMK), rifabutin (RFB), moksifloksasin (MXF) ve linezolid (LZD) ilaçlarına duyarlı olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, izolatların sırasıyla %90'ının siprofloksasin (SIP) ve rifampin (RIF), %47,5'inin doksisisilin (DOX) ve %70'inin trimetoprim/sülfametoksazole (TMP-SMZ) dirençli olduğu gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin MİK ($\mu\text{g/mL}$) sonuçları.

NO	ÖRNEK	AMİKASİN	KLARİTROMİSİN	DOKSİSİKLIN	LINEZOLID	MOKSİFLOKSASİN	RİFABUTİN	RİFAMPİN	SİPROFLOKSASİN	TRİMETOPRİM- SULFAMETOKSAZOL
1	5457	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
2	7335	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
3	3980	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
4	2274	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
5	5076	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$
6	147	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
7	4959	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
8	27	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$

9	6312	2 µg/ ml	0,12 µg/ ml	0,25 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	4 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml
10	4538	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	8 µg/ ml	2 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	2 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml
11	7027	2 µg/ ml	0,5 µg/ ml	1 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	0,5 µg/ ml	8 µg/ ml	4 µg/ ml
12	6533	2 µg/ ml	0,5 µg/ ml	2 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	1 µg/ ml	4 µg/ ml	16 µg/ ml	4 µg/ ml
13	4989	2 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	2 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	4 µg/ ml	8 µg/ ml	8 µg/ ml
14	6536	4 µg/ ml	0,12 µg/ ml	16 µg/ ml	2 µg/ ml	0,5 µg/ ml	1 µg/ ml	2 µg/ ml	8 µg/ ml	0,25 µg/ ml
15	3258	2 µg/ ml	0,5 µg/ ml	0,5 µg/ ml	2 µg/ ml	0,25 µg/ ml	1 µg/ ml	2 µg/ ml	4 µg/ ml	8 µg/ ml
16	8291	2 µg/ ml	0,5 µg/ ml	8 µg/ ml	4 µg/ ml	0,5 µg/ ml	1 µg/ ml	4 µg/ ml	16 µg/ ml	8 µg/ ml
17	5423	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	2 µg/ ml	2 µg/ ml	0,25 µg/ ml	1 µg/ ml	4 µg/ ml	8 µg/ ml	0,25 µg/ ml

Tablo 4.2. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin MİK ($\mu\text{g}/\text{mL}$) sonuçları.

NO	ÖRNEK	AMİKASİN ^v	KLARİTRROMİSİN	DOKSİSİKLIN	LİNEZOLİD	MOKSİFLOKSASİN	RİFABUTİN	RİFAMPİN	SİPROFLOKSASİN	TRİMETOPRİM- SULFAMETOKSAZOL
18	1013	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
19	2401- 2022	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
20	6347	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
21	3254	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
22	4720	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
23	8951	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
24	9732	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
25	5640	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
26	3700	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
27	8398	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
28	6529	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$

29	3650	4 µg/ ml	0,12 µg/ ml	16 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	2 µg/ ml	16 µg/ ml	4 µg/ ml
30	9049	2 µg/ ml	0,12 µg/ ml	2 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	4 µg/ ml	8 µg/ ml	8 µg/ ml
31	890	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	16 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	2 µg/ ml	8 µg/ ml	4 µg/ ml
32	1033	4 µg/ ml	0,5 µg/ ml	16 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	4 µg/ ml	2 µg/ ml	0,25 µg/ ml
33	697	2 µg/ ml	0,12 µg/ ml	0,5 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	1 µg/ ml	4 µg/ ml	16 µg/ ml	8 µg/ ml
34	1666	2 µg/ ml	0,5 µg/ ml	8 µg/ ml	2 µg/ ml	0,25 µg/ ml	1 µg/ ml	2 µg/ ml	8 µg/ ml	8 µg/ ml
35	274	2 µg/ ml	0,25 µg/ ml	8 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	1 µg/ ml	4 µg/ ml	8 µg/ ml	4 µg/ ml
36	1041	4 µg/ ml	0,5 µg/ ml	8 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	2 µg/ ml	8 µg/ ml	0,25 µg/ ml
37	508	2 µg/ ml	0,12 µg/ ml	1 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	4 µg/ ml	8 µg/ ml	0,25 µg/ ml
38	2401- 2023	2 µg/ ml	0,25 µg/ ml	2 µg/ ml	2 µg/ ml	0,5 µg/ ml	0,5 µg/ ml	4 µg/ ml	2 µg/ ml	8 µg/ ml
39	1516	2 µg/ ml	0,25 µg/ ml	16 µg/ ml	4 µg/ ml	0,25 µg/ ml	0,5 µg/ ml	4 µg/ ml	8 µg/ ml	0,25 µg/ ml
40	1123	2 µg/ ml	0,12 µg/ ml	8 µg/ ml	4 µg/ ml	0,5 µg/ ml	0,5 µg/ ml	2 µg/ ml	16 µg/ ml	4 µg/ ml

Kırmızı renkte MİK değerleri: Dirençli

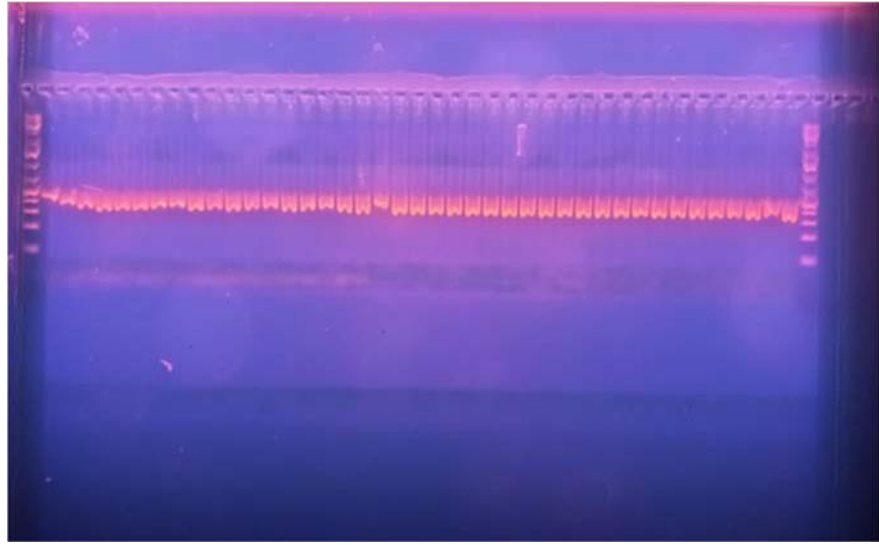
Tablo 4.3. *M. kansasii* klinik izolatları için ilaç duyarlılık sonuçları.

Antimikrobiyal ajan (n=40)	
Amikasin	
MİK değerleri (µg/ml), ortanca (IQR)	2.00 (2.00-3.50)
R, n (%)	0 (0.0)
S, n (%)	40 (100.0)
Klaritromisin	
MİK değerleri (µg/ml), ortanca (IQR)	0.25 (0.25-0.50)
R, n (%)	0 (0.0)
S, n (%)	40 (100.0)
Doksisiklin	
MİK değerleri (µg/ml), ortanca (IQR)	
R, n (%)	19 (47.50)
S, n (%)	13 (32.50)
I, n (%)	8 (20.0)
Linezolid	
MİK değerleri (µg/ml), ortanca (IQR)	4.00 (2.00-4.00)
R, n (%)	0 (0.0)
S, n (%)	40 (100.0)
Moksifloksasin	
MİK değerleri (µg/ml), ortanca (IQR)	0.25 (0.25-0.25)
R, n (%)	0 (0.0)
S, n (%)	40 (100.0)
Rifabutın	
MİK değerleri (µg/ml), ortanca (IQR)	0.50 (0.50-1.00)
R, n (%)	0 (0.0)
S, n (%)	40 (100.0)
Rifampin	
MİK değerleri (µg/ml), ortanca (IQR)	3.00 (2.00-4.00)
R, n (%)	36 (90.0)
S, n (%)	4 (10.0)
Siprofloksasin	
MİK değerleri (µg/ml), ortanca (IQR)	
R, n (%)	36 (90.0)
S, n (%)	1 (2.50)
I, n (%)	3 (7.50)
Trimetoprim/Sülfametoksazol	
MİK değerleri (µg/ml), ortanca (IQR)	8.00/152.00 (0.25/4.75 8.00/152.00)
R, n (%)	28 (70.0)
S, n (%)	12 (30.0)

MİK: minimum inhibitör konsantrasyonu; S: 'Susceptible' (Duyarlı); R: 'Resistant' (Dirençli).

4.2. PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, 40 *M. kansasii* örneğinde *rpoB*, *rbpA*, *gyrA*, *gyrB* ve *rrl* gen bölgelerini çoğaltmak amacıyla konvansiyonel PZR yöntemi uygulanmıştır. Bu gen bölgelerinin amplifikasyonu, her bir örnek için başarıyla gerçekleştirilmiş ve elde edilen PZR ürünleri jel elektroforez yöntemi ile analiz edilmiştir. Aşağıdaki jel elektroforez görüntülerinde, çoğaltılan gen bölgelerine ait bantlar görülmektedir.



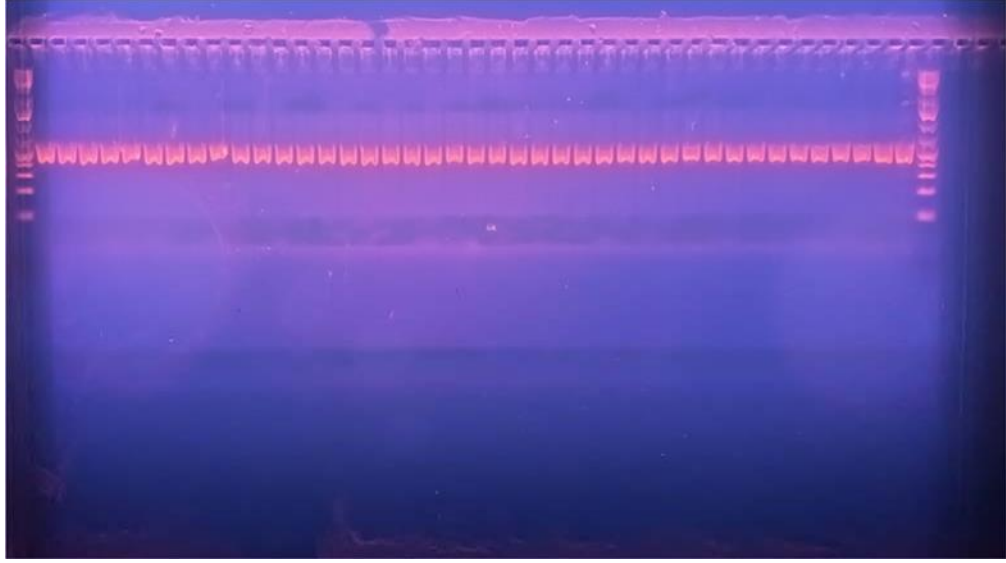
Şekil 4.1. 1-40 numaralı *M. kansasii* (*gyrA*) izolatlarının PZR ürünleri; 1: moleküler ağırlık standardı (Ladder) ; 42: pozitif kontrol; 43: moleküler ağırlık standardı (Ladder); 44: negatif kontrol



Şekil 4.2. 1-40 numaralı *M. kansasii* (*gyrB*) izolatlarının PZR ürünleri; 1: moleküler ağırlık standardı (Ladder) ; 42: pozitif kontrol; 43: moleküler ağırlık standardı (Ladder); 44: negatif kontrol



Şekil 4.3. 1-40 numaralı *M. kansasii* (*rrl*) izolatlarının PZR ürünleri; 1: moleküler ağırlık standardı (Ladder) ; 42: pozitif kontrol; 43: moleküler ağırlık standardı (Ladder); 44: negatif kontrol



Şekil 4.4. 1-40 numaralı *M. kansasii* (*rbpA*) izolatlarının PZR ürünleri; 1: moleküler ağırlık standardı (Ladder) ; 42: pozitif kontrol; 43: moleküler ağırlık standardı (Ladder); 44: negatif kontrol

4.3. Sanger Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, 40 *M. kansasii* izolatında *gyrA*, *gyrB* ve *rrl* gen bölgelerinde mutasyon varlığını belirlemek amacıyla Sanger dizileme (zincir sonlandırma yöntemi) kullanılmıştır. Her gen bölgesine ait diziler, FASTA formatında elde edilerek ilgili referans dizilerle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma için *gyrA* (*Mycobacterium kansasii* ATCC 12478 *gyrA* geni, GenBank: KY934280.1), *gyrB* (*Mycobacterium kansasii* ATCC 12478 *gyrB* geni, GenBank: KY934278.1) ve *rrl* (*Mycobacterium kansasii* ATCC 12478 ribozomal RNA geni, NCBI Referans Dizisi: NR_121961.1) referans dizileri kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, siprofloksasin veya klaritromisine dirençle ilişkili olduğu bilinen *rrl*, *gyrA* ve *gyrB* genlerinde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır.



Şekil 4.5. Örnek 3258 *gyrA*. (Görüntü Seqtrace versiyon 9.0 yazılım programından alınmıştır.)



Şekil 4.6. Örnek 3258 *gyrB*. (Görüntü Seqtrace versiyon 9.0 yazılım programından alınmıştır.)



Şekil 4.7. Örnek 3258 rrl. (Görüntü Seqtrace versiyon 9.0 yazılım programından alınmıştır).

4.4. Oxford Nanopore (ONT) Hedefe Yönelik Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, *rpoB* ve *rbpA* genlerindeki mutasyonların varlığı Nanopore dizileme teknolojisi kullanılarak araştırılmıştır. *M. kansasii* izolatlarının %90'ını oluşturan 40 izolatın 36'sında rifampin (RIF) direnci gözlemlenmiştir. Rifampine dirençli 36 izolat üzerinde ONT hedeflenmiş dizileme yapılmıştır; ancak bu izolatlardan beşinde herhangi bir mutasyon tespit edilememiş, altı izolat ise yetersiz dizileme verileri nedeniyle analiz dışı bırakılmıştır. ONT dizileme yöntemi, 18 izolatla birden fazla mutasyon, 5 izolatla ise tek mutasyon varlığını ortaya koymuştur. 'Rifampin Direnç Belirleyici Bölgesi'nde (Rifampin Resistance-Determining Region, RRDR) en sık görülen mutasyonların 447 ve 457 kodonlarında olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada ilk kez RRDR dışındaki 226, 617, 1191 ve 2555 nükleotidlerinde mutasyonlar tespit edilmiştir (Tablo 5). Dizileme analizleri için referans genom olarak *M. kansasii* ATCC 12478 DNA-directed RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene, partial cds (GenBank: KY933079.1) kullanılmıştır (Tablo 4.6.).

Tablo 4.4. *M. kansasii* izolatlarının *rpoB* genindeki mutasyonların dağılımı.

NO	Örnek	'Coverage' (Derinlik)	Polimorfizm	Varyant Frekans	Nükleotid	Değişim
1	5076	19482	Delesyon (tandem tekrar)	21.3%	2555	(C)3 -> (C)2
2	4959	21828 20,265	Delesyon (tandem tekrar) Delesyon (tandem tekrar)	22.2% 21.0%	617 2555	(G)6 -> (G)5 (C)3 -> (C)2
3	6312	24166 21753 19834 18602	Delesyon (tandem tekrar) Delesyon (tandem tekrar) SNP (transition) SNP (transition)	22.3% 21.6% 68% 62%	617 2555 1341 1371	(G)6 -> (G)5 (C)3 -> (C)2 C -> G G-> C
4	4538	26,650	Delesyon (tandem tekrar)	21.2%	2555	(C)3-> (C)2
5	7027	21,016	Delesyon (tandem tekrar)	22.2%	617	(G)6-> (G)5
6	6533	4,328	Delesyon (tandem tekrar)	25.1%	617	(G)6-> (G)5
7	4989	12.695	Delesyon (tandem tekrar)	20.9%	617	(G)6-> (G)5

		12,394	Delesyon (tandem tekrar)	21.9%	2555	(C)3-> (C)2
8	3258	82,396	Delesyon (tandem tekrar)	20.7%	2555	(C)3-> (C)2
		78,481	SNP (transition)	64.6%	1341	C-> G
9	2401- 2022	14290	Delesyon (tandem tekrar)	21.6%	617	(G)6 -> (G)5
		11,952	Delesyon (tandem tekrar)	20.8%	2555	(C)3 -> (C)2
10	6347	1012	SNP (transition)	12.2%	276	A -> G
		846	SNP (transversion)	10.5%	1191	G -> C
		866	Delesyon (tandem tekrar)	23.1%	2555	(C)3 -> (C)2
11	3254	22507	Delesyon (tandem tekrar)	25.5%	617	(G)6 -> (G)5
		21230	Delesyon (tandem tekrar)	23.3%	2555	(C)3 -> (C)2
		24255	SNP (transition)	49.1%	1341	C -> G

12	4720	10048	Delesyon (tandem tekrar)	26.8%	617	(G)6 -> (G)5
		9406	Delesyon (tandem tekrar)	23.7%	2555	(C)3 -> (C)2
13	8951	17347	Delesyon (tandem tekrar)	26.7%	226	(G)6 -> (G)5
		13929	Delesyon (tandem tekrar)	26.0%	617	(G)6 -> (G)5
		13003	Delesyon (tandem tekrar)	23.9%	2555	(C)3 -> (C)2
14	5640	17652	Deletion (tandem tekrar)	25.1%	617	(G)6 -> (G)5
		16425	Delesyon (tandem tekrar)	23.9%	2555	(C)3 -> (C)2
15	3700	29532	Delesyon (tandem tekrar)	26.2%	617	(G)6 -> (G)5
		27717	Delesyon (tandem tekrar)	23.7%	2555	(C)3 -> (C)2
		24156	SNP (transition)		1341	C -> G
		20603	SNP (transition)	1371	G -> C	

16	6529	4783	Delesyon (tandem tekrar)	25.2%	2555	(C)3 -> (C)2
17	3650	42270	Delesyon (tandem tekrar)	25.4%	617	(G)6 -> (G)5
		39300	Delesyon (tandem tekrar)	24.1%	2555	(C)3 -> (C)2
18	890	5404	Delesyon (tandem tekrar)	25.7%	617	(G)6 -> (G)5
		5137	Delesyon (tandem tekrar)	23.4%	2555	(C)3 -> (C)2
19	274	17895	Delesyon (tandem tekrar)	25.3%	617	(G)6 -> (G)5
		16800	Delesyon (tandem tekrar)	23.8%	2555	(C)3 -> (C)2
20	1516	29403	Delesyon (tandem tekrar)	24.7%	617	(G)6 -> (G)5
		28099	Delesyon (tandem tekrar)	24.1%	2555	(C)3 -> (C)2
		33567	SNP (transition)	28,5%	1341	C -> G

21	1123	11356	Delesyon (tandem tekrar)	25.6%	617	(G)6 -> (G)5
		11187	Delesyon (tandem tekrar)	24.4%	2555	(C)3 -> (C)2
22	2507	51982	Delesyon (tandem tekrar)	23.3%	2555	(C)3 -> (C)2
		47712	SNP (transition)	71.9%	1341	C -> G
23	533	43330	Delesyon (tandem tekrar)	26.0%	226	(G)6 -> (G)5
		40426	Delesyon (tandem tekrar)	25.4%	617	(G)6 -> (G)5
		38886	Delesyon (tandem tekrar)	25.2%	2555	(C)3 -> (C)2

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Tüberküloz Birimi, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (HSGM) Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda izole edilen 40 *M. kansasii* izolatu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HSGM'de tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) tür tayını yapılarak *M. kansasii* izolatları tanımlanmıştır. Bu çalışmada Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M24S-Ed2 klavuzu esas alınarak *M. kansasii* ATCC 12478 antimikrobiyal duyarlılık kontrol suşu referans olarak kullanılmıştır. Mikobakterilerde, özellikle *Mycobacterium avium* kompleksi (MAC) ve *Mycobacterium abscessus*'ta klaritromisin direnci, öncelikle 23S ribozomal RNA'yı kodlayan *rml* genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Bu mutasyonlar, genellikle domain V'nin peptidil transferaz bölgesinde, özellikle 2058 ve 2059 (*Escherichia coli* numaralandırmasına göre) pozisyonlarında meydana gelir ve A2058G, A2058C ve A2059G gibi nükleotid değişimlerine yol açar (88). Bu değişiklikler, klaritromisinin ribozoma bağlanmasını engelleyerek, onun bakteriyostatik ve bakterisidal aktivitesini azaltır. Halime ve ark. çalışmalarında, 14 *M. kansasii* izolatının tamamını (%100) klaritromisine duyarlı rapor etmişlerdir (89). Maria ve ark. çalışmalarındaki 66 (%100) izolatın tamamını klaritromisine duyarlı olarak bildirmişlerdir (90). Ting-Shu ve ark. 37 *M. kansasii* izolatının tümünü (%100) klaritromisine duyarlı tespit etmişlerdir (91). Bakula ve ark. çalışmalarında, 85 *M. kansasii*'nin 1'ini (%1,2) klaritromisine dirençli, 84'ünü (%98,8) duyarlı olarak tespit etmişlerdir (92). Yanming ve ark. 56 *M. kansasii* subtype I izolatının 15'ni (%26,8) klaritromisine dirençli tespit etmişlerdir (93). Yinjuan ve ark. 60 *M. kansasii* izolatının 59'unu (%98,3) klaritromisine duyarlı, 1'ini (%1,67) ise dirençli saptamışlardır (94). de Carvalho ve ark. 69 *M. kansasii* izolatının 68'sini (%99) klaritromisine duyarlı, 1'ini (%1) klaritromisine dirençli saptamışlardır (95). Çalışmamızda da 40 *M. kansasii* izolatının tümü (%100) klaritromisine duyarlı olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan izolatların klaritromisine duyarlılık oranları literatürdeki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Amikasin direnci öncelikle 16S ribozomal RNA'yı kodlayan *rrs* genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Amikasin direnci ile bağlantılı en yaygın mutasyonlar, *rrs* geninde (*Escherichia coli* numaralandırmasına göre) 1408 ve 1491 pozisyonlarında meydana gelir. A1408G gibi nükleotid değişimleri, amikasinin ribozomal A bölgesine bağlanmasını engelleyerek protein sentezinin etkili şekilde inhibe edilmesini önler (96). Özellikle A1408G mutasyonu, *M. tuberculosis*'te yüksek seviyeli amikasin direncinin bir göstergesi olarak kabul edilir. *rrs* mutasyonlarına ek olarak, ilaç geçirgenliğini veya dışa atımını (efluks) düzenleyen genlerdeki değişiklikler de direnç gelişimine yol açabilir. Örneğin, *tap* gibi dışa atım pompa sistemlerinin aşırı ifade edilmesi, amikasinin hücre içi konsantrasyonlarını azaltarak belirli mikobakteri türlerinde dirence katkıda bulunabilmektedir (97). Halime ve ark. çalışmalarında, 14 *M. kansasii* izolatının 11'ni (%77) amikasinine duyarlı rapor etmişlerdir (89). Da Silva ve ark. çalışmalarındaki 64 (%97) izolatı duyarlı ve 2 (%3) izolatı dirençli olarak bildirmişlerdir (90). Ting-Shu ve ark. 37 *M. kansasii* izolatının 36'sını (%97,3) amikasinine duyarlı tespit etmişlerdir (91). Bakula ve ark. çalışmalarında, 85 *M. kansasii*'nin tümünü (%100) amikasinine duyarlı, olarak tespit etmişlerdir (92). Yanming ve ark. 56 *M. kansasii* subtip I izolatının 4'ünü (%7,1) dirençli tespit etmişlerdir. Yinjuan ve ark. 60 *M. kansasii* izolatının 54'ünü (%90) amikasinine duyarlı, 10'unu (%6) ise dirençli saptamışlardır (93). de Carvalho ve ark. 69 *M. kansasii* izolatının 69'unu (%100) amikasinine duyarlı saptamışlardır (95). Çalışmamızda da 40 *M. kansasii* izolatının tümü (%100) amikasinine duyarlı tespit edilmiştir. Sonuçlarımız literatürdeki bazı çalışmalarla uyumlu bulunurken, bazı çalışmalardaki oranlara göre ise daha yüksek direnç oranları elde edildiği gözlenmiştir.

Rifabutin ve rifampin direnci, öncelikle RNA polimerazın β -alt birimini kodlayan *rpoB* genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Bu mutasyonlar, rifamisinlerin RNA polimeraza bağlanmasını engelleyerek inhibitör etkinliklerini azaltır. Bu mutasyonların çoğu, yüksek derecede korunmuş bir bölge olan rifampin direnci belirleyici bölgesinde (RRDR) meydana gelir ve bu bölge, 507 ile 533 kodonlarını kapsar (*E. coli* numaralandırmasına göre) (98). RRDR içinde yer alan temel mutasyonlar arasında S531L, H526D/Y ve D516V bulunur ve bunlar sıklıkla rifampin dirençli suşlarda tespit edilir.

Mutasyonlar rifabutine karşı da direnç kazandırır, ancak direnç düzeyi değişkenlik gösterebilir. Örneğin, *rpoB* mutasyonlarından D516V ve H526D, rifabutine karşı kısmi bir duyarlılığa neden olabilir ve bu da rifampin direnci bulunması durumunda rifabutini potansiyel bir alternatif haline getirebilir (99). RRDR dışındaki L511P gibi kodonlarda ve *rpoB* geninin diğer bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar da rifampisin direnci ile ilişkilendirilmiştir, ancak bu mutasyonlar daha az yaygındır (100).

rpoB mutasyonlarının ötesindeki direnç mekanizmaları, örneğin dışa atım pompalarının aşırı ifade edilmesi gibi, tüberküloz dışı mikobakterilerde rifampisin direncine katkıda bulunabilir (101). Bu durum, farklı mikobakteri türlerinde direncin karmaşıklığını ve mutasyonların doğru bir şekilde tespit edilmesi ile uygun tedavinin yönlendirilmesinin önemini vurgular. *rpoB* mutasyonlarının, çizgi prob analizleri, yeni nesil dizileme veya diğer moleküler araçlar aracılığıyla tespiti, çok ilaca dirençli tüberküloz (MDR-TB) ve dirençli TDM'nin neden olduğu enfeksiyonların yönetimi için hayati öneme sahiptir. Halime ve ark. çalışmalarında, 14 *M. kansasii* izolatının 14'ünü (%100) rifabutine duyarlı olarak rapor etmişlerdir (89). Maria ve ark. çalışmalarında 63 (%97) izolatı duyarlı ve 2 (%3) izolatı dirençli olarak bildirmişlerdir (90). Ting-Shu ve ark. 37 *M. kansasii* izolatının 36'sını (%97,3) rifabutine duyarlı olarak tespit etmişlerdir (91). Bakuła ve ark. çalışmalarında, 85 *M. kansasii* izolatının tümünü (%100) duyarlı olarak tespit etmişlerdir (92). Yanming ve ark. 56 *M. kansasii* subtip I izolatının 19'unu (%33,9) dirençli tespit etmişlerdir (93). Yinjuan ve ark. 60 *M. kansasii* izolatının tümünü (%100) rifabutine (%100) duyarlı olarak saptamışlardır (102). Çalışmamızda da 40 *M. kansasii* izolatının tümü (%100) rifabutine duyarlı olarak tespit edilmiştir. Sonuçlarımızın yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Halime ve ark. çalışmalarında, 14 *M. kansasii* izolatının 9'unu (%64) rifampine duyarlı olarak rapor etmişlerdir (89). Maria ve ark. çalışmalarındaki 55 (%85) izolatı duyarlı ve 10 izolatı (%15) dirençli olarak bildirmişlerdir (90). Ting-Shu ve ark. 37 *M. kansasii* izolatının 29'unu (%78,4) rifampine duyarlı tespit etmişlerdir (91). Bakuła ve ark. çalışmalarında, 85 *M. kansasii* izolatının tümünü (%100) rifampine duyarlı olarak

tespit etmişlerdir (92). Yanming ve ark. 56 *M. kansasii* subtip I izolatın 31'sini (%55,4) dirençli tespit etmişlerdir. Yinjuan ve ark. 60 *M. kansasii* izolatının 48'ini (%80) rifampine duyarlı, 12'sini (%20) ise dirençli olarak saptamışlardır (93).

de Carvalho ve ark. 69 *M. kansasii* izolatının 61'sini (%88) rifampine duyarlı, 8'ini (%12) rifampine dirençli saptamışlardır (95). Akrami ve ark. da 46 *M. kansasii* izolatının 26'sını (%56,5) rifampine duyarlı, 20'sini (%43,5) ise dirençli bulmuşlardır (103). Çalışmamızda da 40 *M. kansasii* izolatının 36'sının (%90) dirençli olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımız direnç oranımızın önceki çalışmalardaki direnç oranlarına göre daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Linezolid direnci, öncelikle 23S ribozomal RNA genindeki (*rrl*) ve ribozomal protein L3 genindeki (*rplC*) mutasyonlarla ilişkilidir. Bu mutasyonlar, linezolidin ribozomal peptidil transferaz merkezine bağlanmasını engelleyerek, protein sentezini etkili bir şekilde inhibe etme yeteneğini azaltır. *rpl* geninde en yaygın bildirilen mutasyonlar 23S rRNA'nın domain V bölgesinde bulunan G2061T, G2270T ve C2611T (*E. coli* numaralandırmasına göre) pozisyonlarında meydana gelir. Bu mutasyonlar, ribozomal bağlanma yerinin yapısını değiştirerek linezolidin ribozoma olan afinitesini azaltır (104). Ayrıca, *rplC* geninde, C154R gibi mutasyonlar, linezolid direnci gösteren *M. tuberculosis* klinik izolatlarında tanımlanmıştır. Ribozomal protein L3'teki bu değişiklikler, linezolidin ribozoma bağlanmasını da etkileyebilir (105).

Halime ve ark. çalışmalarında, 14 *M. kansasii* izolatını (%100) linezolide duyarlı olarak rapor etmişlerdir (89). Bakula ve ark. çalışmalarında, 85 *M. kansasii* izolatının tümünü (%100) linezolide duyarlı olarak tespit etmişlerdir (92). Yanming ve ark. 56 *M. kansasii* subtip I izolatının 19'unu (%25) dirençli tespit etmişlerdir (93). Yinjuan ve ark. 60 *M. kansasii* izolatının 55'ini (%91,7) linezolide duyarlı, 5'ini (%8,3) dirençli saptamışlardır (102). Akrami ve ark. da 46 *M. kansasii* izolatının 4'ünü (%8,6) linezolide orta duyarlı, 41'ini (%89,1) dirençli saptarken bir izolatı (%2,2) duyarlı bulmuşlardır (103). Çalışmamızda da 40 *M. kansasii* izolatının tümü (%100) linezolide duyarlı tespit edilmiştir. Sonuçlarımızın literatürdeki çalışmalarla uyumlu

olduğu görülmüştür. Bazı çalışmalarda linezolid direnci daha yüksek oranda tespit edilmiştir.

Moksifloksasin ve siprofloksasin direnci, ağırlıklı olarak *gyrA* ve *gyrB* genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Bu genler, florokinolonların hedefi olan DNA girazın A ve B alt birimlerini kodlar. Bu genlerin kinolon direnci belirleyici bölgesindeki (QRDR) mutasyonlar, florokinolonların DNA giraza bağlanmasını engelleyerek, bakteriyel DNA replikasyonu üzerindeki inhibitör etkilerini azaltır (106).

gyrA geninde moksifloksasin ve siprofloksasin direnci ile ilişkili en yaygın mutasyonlar 90 (A90V), 91 (S91P) ve 94 (D94G, D94N, D94A veya D94H) kodonlarında meydana gelir. Bu mutasyonlar, özellikle *M. tuberculosis*'te kritik öneme sahiptir, çünkü her iki ilaç için minimum inhibitör konsantrasyonlarda (MIC) belirgin bir artışa neden olurlar (107). *gyrB* genindeki N538D ve E540V gibi mutasyonların da dirence katkıda bulunduğu bildirilmiştir, ancak bu mutasyonlar *gyrA* mutasyonlarına kıyasla daha az yaygındır (108).

gyrA ve *gyrB* genlerindeki genetik mutasyonların yanı sıra, özellikle tüberküloz dışı mikobakterilerde, dışa atım pompalarının aşırı ifadesi de siprofloksasin ve moksifloksasin direncine aracılık edebilmektedir. *MmpL* ve *MmpS* ailesi gibi dışa atım pompaları, hücre içi ilaç konsantrasyonlarını azaltarak florokinolonların etkinliğini daha da düşürür (109).

Halime ve ark. çalışmalarında, 14 *M. kansasii* izolatının 11'ni (%79) moksifloksasine duyarlı rapor etmişlerdir (89). Ting-Shu ve ark. 37 *M. kansasii* izolatının 22'sini (%59,5) duyarlı ve 15'ni (%40,5) dirençli tespit etmişlerdir (91). Bakula ve ark. çalışmalarında, 85 *M. kansasii* izolatının tümünü (%100) moksifloksasine duyarlı olarak tespit etmişlerdir (92). Yanming ve ark. 56 *M. kansasii* subtip I izolatının 11'ini (%33,9) dirençli tespit etmişlerdir (93). Yinjuan ve ark. 60 *M. kansasii* izolatının 53'ünü (%88,3) moksifloksasine duyarlı, 7'sini (%11,7) dirençli saptamışlardır (102). de Carvalho ve ark. 69 *M. kansasii* izolatının 69'unu (%100)

moksifloksasine duyarlı saptamışlardır (95). Akrami ve ark. da 46 *M. kansasii* izolatının 10'unu (%21,7) moksifloksasine orta duyarlı, 6'sını (%13,0) dirençli saptarken 30'unu (%65,2) duyarlı olarak bulmuşlardır (103). Çalışmamızda da 40 *M. kansasii* izolatının tümü (%100) moksifloksasine duyarlı tespit edilmiştir. Sonuçlarımız literatürdeki bazı çalışmalarla uyumluyken, İran'daki gibi bazı çalışmalara göre duyarlılık oranlarımız daha yüksek çıkmıştır.

Halime ve ark. çalışmalarında, 14 *M. kansasii* izolatının 14'ünü (%100) siprofloksasine dirençli rapor etmişlerdir (89). Maria ve ark. çalışmalarındaki 22 (%33) izolatın duyarlı ve 44 (%67) izolatın dirençli olduğunu bildirmişlerdir (90). Ting-Shu ve ark. 37 *M. kansasii* izolatının 26'sını (%70,3) siprofloksasine duyarlı tespit etmişlerdir (91). Bakula ve ark. çalışmalarında, 85 *M. kansasii* izolatının 17'sini (%20) siprofloksasine dirençli olarak tespit etmişlerdir (92).

Yinjuan ve ark. 60 *M. kansasii* izolatının 16'sını (%26,7) siprofloksasine duyarlı, 44'ünü (%73,3) siprofloksasine dirençli, saptamışlardır (102). de Carvalho ve ark. 69 *M. kansasii* izolatının 34'ünü (%49) siprofloksasine duyarlı, 35'ini (%51) ise siprofloksasine dirençli saptamışlardır (95). Çalışmamızda 40 *M. kansasii* izolatının 36'sı (%90) siprofloksasine dirençli, 4'ü (%10) duyarlı olarak tespit edilmiştir. Sonuçlarımız direnç oranımızın önceki çalışmalardaki direnç oranlarına göre daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Doksisiklin, birinci nesil tetrasiklinlere kıyasla artmış oral biyoyararlanımı ve dokulara penetrasyonu nedeniyle ikinci nesil tetrasiklin olarak sınıflandırılmaktadır. Bu özellikleri, önceki tetrasiklinlere göre geliştirilmiş lipofilik yapısından kaynaklanmaktadır (111). Etki mekanizması, mikrobiyal protein sentezini 30S ribozomal alt birimlerine bağlanarak inhibe etmektir. 16S rRNA veya ribozomal proteinlerdeki mutasyonlar, doksisiklinin 30S alt birimindeki bağlanma bölgesini değiştirerek ilacın afinitesini ve etkinliğini azaltabilir (112). Wang ve ark. çalışmalarında 153 *M. kansasii* izolatının 73'ünü (%47,71) doksisikline karşı dirençli olarak bildirmişlerdir (113). Çalışmamızda da 40 *M. kansasii* izolatının 19'u (%47,50) doksisikline dirençli tespit edilmiştir. Sonuçlarımız literatürdeki çalışmaların bazısı ile

uyumluyken, direnç oranımız bazı çalışmalara göre daha yüksek çıkmıştır.

Mikobakterilerde, özellikle *Mycobacterium abscessus* ve *Mycobacterium avium* kompleksi (MAC) gibi tüberküloz dışı mikobakterilerde (NTM), trimetoprim/sülfametoksazol (TMP/SMX) direnci, folat biyosentez yolundaki anahtar enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlarla ilişkilidir. TMP/SMX, dihidrofolat redüktaz (DHFR) ve dihidropteroat sentazı (DHPS) inhibe ederek, folat sentezi ve bakteriyel büyüme için kritik öneme sahip bu enzimlerin işlevini engeller (114). DHPS'yi kodlayan *folP1* genindeki mutasyonlar, genellikle sülfametoksazol direnciyle ilişkilidir. Bu mutasyonlar, sülfametoksazolün DHPS'ye bağlanma afinitesini azaltarak ilacın etkinliğini düşürür (115).

Trimetoprim direnci genellikle DHFR'yi kodlayan *dfrA* genindeki mutasyonlara atfedilir. DHFR'nin aktif bölgesindeki A26T ve F98Y gibi değişiklikler, trimetoprimin bağlanmasını önemli ölçüde azaltarak dirence yol açabilir (116).

Bazı NTM türlerinde *MmpL* ailesi gibi dışa atım pompalarının aşırı ifadesi de TMP/SMX direncine neden olabirse de, bu mekanizma henüz tam olarak tanımlanmamıştır (117).

Halime ve ark. çalışmalarında, 14 *M. kansasii* izolatının 14'ünü de (%100) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli rapor etmişlerdir (89). Ting-Shu ve ark. 37 *M. kansasii* izolatının 30'unun (%81,1) trimetoprim/sülfametoksazole duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir (91). Bakula ve ark. çalışmalarında, 85 *M. kansasii* izolatının tümünü (%100) trimetoprim/sülfametoksazole duyarlı olarak tespit etmişlerdir (92). Yinjuan ve ark. 60 *M. kansasii* izolatının 41'ini (%68,3) trimetoprim/sülfametoksazole duyarlı, 19'ünü (%31,7) ise dirençli saptamışlardır (102). de Carvalho ve ark. 69 *M. kansasii* izolatının 3'ünü (%4) trimetoprim/sülfametoksazole duyarlı, 66'sını (%96) dirençli saptamışlardır (95). Çalışmamızda da 40 *M. kansasii* izolatının 28'i (%70) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli ve 12'si (%30) duyarlı olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda saptanan direnç oranları önceki bazı çalışmalardaki direnç oranları ile uyumlu çıkarken, bazı çalışmalarda daha yüksek veya daha düşük direnç oranları

saptandığı görülmektedir.

Çalışmamızda fenotipik duyarlılık testlerine ek olarak, fluorokinolonlar, rifampin ve klaritromisinde dirençten sorumlu mutasyonların varlığını tespit etmek için Sanger ve yeni nesil dizileme yöntemleri uygulanmıştır. Klein ve ark 6 rifampine dirençli izolatın 4'ünde 513, 526, 531 kodonlarında mutasyonları tespit etmişlerdir. Akrami ve ark. 20 rifampin dirençli izolatının 3'ünde 1249 (417) 1356 (452), 1407 (469), 1479 (493), 1533 (511), 1536 (512) kodonlarında mutasyonları tespit etmişlerdir (103). Biz de çalışmamızda 25 izolattan 6'sında, 447 ve 457 kodonlarında mutasyon varlığını saptadık. Ayrıca, *rpoB* geninde RRDR bölgesinin dışında, ilk kez olarak, 226, 617, 1191 ve 2555 nükleotidlerinde yeni mutasyonları tespit ettik.

Baku'a ve ark. çalışmalarında, 17 siprofloksasin dirençli izolatta *gyrA*, *gyrB* bölgelerinde mutasyon tespit edememişlerdir. Sadece bir klaritromisin dirençli izolatta *rrl* geninde A2266C mutasyonunu saptamışlardır (92). Akrami ve ark. moksifloksasin dirençli izolatlarında, *gyrA* gen bölgesinde 238, 239 (80), 247, 249 (83), 257, 258 (86), 260, 261 (87) kodonlarında ve *gyrB* gen bölgesinde 602, 603 (201), 950 (317), 1332 (444), 1339 (447), 1390, 1392 (464), 1406 (469), 1594 (532) ve *rrl* gen bölgesinde 2058, 2059, 2266 nükleotidlerinde mutasyonlar tespit etmişlerdir (103).

Çalışmamızda Sanger dizileme sonucunda *gyrA*, *gyrB*, *rrl* genlerinde mutasyon tespit edilmemiştir. Bu durum, *M. kansasii* direncine neden olan başka mekanizmaların var olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Tüberküloz Birimi ve Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda izole edilen 40 *M. kansasii* izolatının sıvı mikrodilüsyon yöntem ile duyarlılıkları, 'Clinical and Laboratory Standards Institute' (CLSI) M24S-Ed2 rehberi doğrultusunda belirlenmiştir. Çalışma sonucunda 40 izolatın amikasin (AMK), klaritromisin (CLA), linezolid (LZD), moksifloksasin (MXF) ve rifabutine (RFB) duyarlı olduğu ve bu izolatların %90'ının siprofloksasin (SIP) ve rifampine (RIF) dirençli oldukları saptanmıştır.

Bu çalışmada referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi, Sensititre SLOMYCO ticari kitleri kullanılarak uygulanmıştır. CLSI M24S-Ed2 rehberi doğrultusunda 2023 yılından itibaren *M. kansasii* duyarlılık testlerinde doksisisiklin ve minosiklin antimikrobiale ilaçların duyarlılığın belirlenmesi önerilmektedir. Bu çalışmada, şimdiye kadar yapılmış ikinci çalışma olarak, doksisisiklin duyarlılığı *M. kansasii*'de değerlendirilmiş ve doksisisikline karşı Türkiye'de direnç artışı olduğu tespit edilmiştir. Ancak, Sensititre SLOMYCO panelinde minosiklin bulunmadığı için minosiklinin duyarlılık testi yapılamamıştır. Çalışmamızda, birinci basamak ilacı olarak bilinen ve *M. kansasii* enfeksiyonların tedavisinde kullanılan rifampine karşı yüksek direnç oranı tespit edilmiştir. Bu durumu göz önüne alarak rifabutinin gibi alternatif ilaçların kullanılması önerilmektedir. Bu çalışma sonucunda, ülkemizde *M. kansasii*'ye karşı rifampin direncinde artışı teyit etmek amacıyla, E-test yönteminin de kullanıldığı çok merkezli çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, *gyrA*, *gyrB* ve *rrl* genlerinde dirence neden olabilen mutasyonlar Sanger dizileme yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca, dünyada ilk kez *M. kansasii* izolatlarında Nanopore dizileme ile *rpoB*, *rbpA* dizilemesi yapılmış ve bazı rifampin direnci olan örneklerde *rpoB* bölgesinde yeni mutasyonlar tespit edilmiştir. Diğer rifampin direnci olan ancak *rpoB* bölgesinde mutasyon bulunamayan izolatlarda, dışa atım pompası genleri, RNA polimerazın diğer bileşenlerindeki

mutasyonlar, mobil genetik elemanlar veya plazmid aracılı direnç mekanizmalarının devreye girmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle *M. kansasii* izolatlarında ilaç direncinin ve ilaç direncine neden olan mutasyonların tüm genom dizileme gibi genişletilmiş genetik analizlerle saptanması, bu enfeksiyonların kontrol altına alınmasına büyük katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Cook JL. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *Br Med Bull*. 2010 Dec 1;96(1):45–59.
2. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Feb 15;175(4):367–416.
3. Ratnatunga CN, Lutzky VP, Kupz A, Doolan DL, Reid DW, Field M, et al. The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease. *Front Immunol*. 2020 Mar 3; 11:303.
4. Taillard C, Greub G, Weber R, Pfyffer GE, Bodmer T, Zimmerli S, et al. Clinical Implications of *Mycobacterium kansasii* Species Heterogeneity: Swiss National Survey. *J Clin Microbiol*. 2003 Mar;41(3):1240–4.
5. Bakula Z, Modrzejewska M, Pennings L, Proboszcz M, Safianowska A, Bielecki J, et al. Drug Susceptibility Profiling and Genetic Determinants of Drug Resistance in *Mycobacterium kansasii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Apr;62(4):e01788-17.
6. Nasiri MJ, Haecili M, Ghazi M, Goudarzi H, Pormohammad A, Imani Fooladi AA, et al. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria. *Front Microbiol*. 2017 Apr 25;8:681.
7. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ, Andrejak C, et al. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. *Clin Infect Dis*. 2020 Aug 14;71(4):905–13.
8. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med*. 2006 Nov;100(11):1862–70.
9. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet*. 2013 Oct;45(10):1176–82.
10. Sion C, Degraux J, Delmée M. Early Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* Using the Polymerase Chain Reaction on Samples Positive by a Rapid Commercial Culture System. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999 Jun 11;18(5):346–51.
11. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in Sputum Samples. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2616–22.
12. Ferrari V, Serpi M. Nucleoside Analogs and Tuberculosis: New Weapons Against an Old Enemy. *Future Med Chem*. 2015 Mar;7(3):291–314.

13. Kazda J. The Chronology of Mycobacteria and the Development of Mycobacterial Ecology. In: The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009 [cited 2025 Jan 20]. p. 1–11. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-9413-2_1
14. Kazda J. The Chronology of Mycobacteria and the Development of Mycobacterial Ecology. In: The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009 [cited 2025 Jan 20]. p. 1–11. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-9413-2_1
15. Dajani J, Shakhshir A, Sawalmeh A, Awashra A, Dweekat M, Al-ali K, et al. First recorded isolation of *Mycobacterium kansasii* in a nonendemic setting. *Radiol Case Rep.* 2025 Feb;20(2):1135–40.
16. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2003 Feb;83(1–3):91–7.
17. Brennan PJ, Nikaido H. THE ENVELOPE OF MYCOBACTERIA. *Annu Rev Biochem.* 1995 Jun;64(1):29–63.
18. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson MC, Salfinger M, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2018 Apr;31(2):e00038-17.
19. Collins CH, Lyne PM, Grange JM. *Microbiological methods.* 6th ed. London Boston Singapore: Butterworths; 1989.
20. Cheesbrough M. *District laboratory practice in tropical countries.* 2nd ed. Cambridge ; New York: Cambridge University Press; 2005. 2 p. (Tropical health technology).
21. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998 Nov;396(6707):190–190.
22. Vissa VD, Brennan PJ. [No title found]. *Genome Biol.* 2001;2(8):reviews1023.1.
23. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, Johnson PDR, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* 2008 May;18(5):729–41.
24. Marrakchi H, Lanéelle MA, Daffé M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chem Biol.* 2014 Jan;21(1):67–85.
25. Gröschel MI, Sayes F, Simeone R, Majlessi L, Brosch R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat Rev Microbiol.* 2016 Nov;14(11):677–91.
26. Cambier CJ, Takaki KK, Larson RP, Hernandez RE, Tobin DM, Urdahl KB, et al. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of

- membrane lipids. *Nature*. 2014 Jan;505(7482):218–22.
27. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, et al. Non Mycobacterial Virulence Genes in the Genome of the Emerging Pathogen *Mycobacterium abscessus*. Ahmed N, editor. *PLoS ONE*. 2009 Jun 19;4(6):e5660.
 28. Mahapatra S, Scherman H, Brennan PJ, Crick DC. N Glycolylation of the Nucleotide Precursors of Peptidoglycan Biosynthesis of *Mycobacterium* spp. Is Altered by Drug Treatment. *J Bacteriol*. 2005 Apr;187(7):2341–7.
 29. Dmitriev BA, Ehlers S, Rietschel ET, Brennan PJ. Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: From horizontal layers to vertical scaffolds. *Int J Med Microbiol*. 2000 Jul;290(3):251–8.
 30. Daffé M, Draper P. The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to their Pathogenicity. In: *Advances in Microbial Physiology* [Internet]. Elsevier; 1997 [cited 2025 Jan 21]. p. 131–203. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065291108600168>
 31. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jul;16(3):463–96.
 32. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*. 1994 Oct;123(1–2):11–8.
 33. Vollmer W, Bertsche U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2008 Sep;1778(9):1714–34.
 34. Girardin SE, Travassos LH, Hervé M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, et al. Peptidoglycan Molecular Requirements Allowing Detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem*. 2003 Oct;278(43):41702–8.
 35. Takayama K, Wang C, Besra GS. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Jan;18(1):81–101.
 36. Jankute M, Cox JAG, Harrison J, Besra GS. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annu Rev Microbiol*. 2015 Oct 15;69(1):405–23.
 37. Heijenoort JV. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*. 2001 Mar 1;11(3):25R–36R.
 38. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Mar;32(2):168–207.
 39. El-Halfawy OM, Valvano MA. Chemical Communication of Antibiotic Resistance by a Highly Resistant Subpopulation of Bacterial Cells. Bundy JG, editor. *PLoS ONE*. 2013 Jul 3;8(7):e68874.
 40. Goffin C, Ghuysen JM. Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic

- Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Dec;62(4):1079–93.
41. Armstrong DT, Parrish N. Current Updates on Mycobacterial Taxonomy, 2018 to 2019. McAdam AJ, editor. *J Clin Microbiol.* 2021 Jun 18;59(7):e01528-20.
 42. Aslan G, Ersoy L. Nontuberculous mycobacterial infections: pathogenesis and risk factors, diagnosis, treatment, immune response. *Turk Bull Hyg Exp Biol.* 2024;81(1):103–18.
 43. Runyon EH. Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. *Med Clin North Am.* 1959 Jan;43(1):273–90.
 44. Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger EC. Towards a Phylogeny and Definition of Species at the Molecular Level within the Genus Mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 1990 Oct 1;40(4):323–30.
 45. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus Mycobacterium into an Emended Genus Mycobacterium and Four Novel Genera. *Front Microbiol.* 2018 Feb 13;9:67.
 46. Falkinham, Iii JO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol.* 2009 Aug;107(2):356–67.
 47. Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LE. The Mycobacterium avium complex. *Clin Microbiol Rev.* 1993 Jul;6(3):266–310.
 48. Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Diseases in Immunocompetent Patients. *Korean J Radiol.* 2002;3(3):145.
 49. Horsburgh CR. Epidemiology of mycobacterial diseases in AIDS. *Res Microbiol.* 1992;143(4):372–7.
 50. Dheda K, Barry CE, Maartens G. Tuberculosis. *The Lancet.* 2016 Mar;387(10024):1211–26.
 51. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Oct 14;100(21):12420–5.
 52. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- γ immunity. *Semin Immunol.* 2014 Dec;26(6):454–70.
 53. Misch EA, Saddler C, Davis JM. Skin and Soft Tissue Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria. *Curr Infect Dis Rep.* 2018 Apr;20(4):6.
 54. Bernard L, Vincent V, Lortholary O, Raskine L, Vettier C, Colaitis D, et al. Mycobacterium kansasii Septic Arthritis: French Retrospective Study of 5 Years and Review. *Clin Infect Dis.* 1999 Dec 1;29(6):1455–60.

55. Neuberger A, Sprecher H, Oren I. Septic Arthritis Caused by *Mycobacterium kansasii* in a Prosthetic Knee Joint. *J Clin Microbiol*. 2006 Jul;44(7):2648–9.
56. Kim JH, Seo KW, Shin Y, Oh JS, Jun JB, Jeong J, et al. Risk factors for developing *Mycobacterium kansasii* lung disease: A case-control study in Korea. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Feb;98(5):e14281.
57. Handley G, Hand J. Adverse Effects of Immunosuppression: Infections. In: Eisen HJ, editor. *Pharmacology of Immunosuppression* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [cited 2025 Jan 21]. p. 287–314. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 272). Available from: https://link.springer.com/10.1007/164_2021_550
58. Johnston JC, Chiang L, Elwood K. *Mycobacterium kansasii*. Schlossberg D, editor. *Microbiol Spectr*. 2017 Feb 24;5(1):5.1.21.
59. Evans AJ, Crisp AJ, Hubbard RB, Colville A, Evans SA, Johnston ID. Pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection: comparison of radiological appearances with pulmonary tuberculosis. *Thorax*. 1996 Dec 1;51(12):1243–7.
60. Shitrit D, Priess R, Peled N, Bishara G, Shlomi D, Kramer MR. Differentiation of *Mycobacterium kansasii* infection from *Mycobacterium tuberculosis* infection: comparison of clinical features, radiological appearance, and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Sep 4;26(10):679–84.
61. Johnston JC, Chiang L, Elwood K. *Mycobacterium kansasii*. Schlossberg D, editor. *Microbiol Spectr*. 2017 Feb 24;5(1):5.1.21.
62. Syre H, Myneedu VP, Arora VK, Grewal HMS. Direct Detection of Mycobacterial Species in Pulmonary Specimens by Two Rapid Amplification Tests, the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test and the GenoType Mycobacteria Direct Test. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3635–9.
63. Khosravi AD, Hashemzadeh M, Rokhfirooz P. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria using the rpoB, argH and cya genes analysis. *AMB Express*. 2022 Sep 19;12(1):121.
64. Kurz SG, Zha BS, Herman DD, Holt MR, Daley CL, Ruminjo JK, et al. Summary for Clinicians: 2020 Clinical Practice Guideline Summary for the Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2020 Sep;17(9):1033–9.
65. Huang HL, Lu PL, Lee CH, Chong IW. Treatment of pulmonary disease caused by *Mycobacterium kansasii*. *J Formos Med Assoc*. 2020 Jun;119:S51–7.
66. Haworth CS, Banks J, Capstick T, Fisher AJ, Gorsuch T, Laurenson IF, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax*. 2017 Nov;72(Suppl 2):ii1–64.
67. Graybill JR. Treatment alternatives for *Mycobacterium kansasii*. *J Antimicrob*

- Chemother. 2001 Apr 1;47(4):417–20.
68. Haworth CS, Banks J, Capstick T, Fisher AJ, Gorsuch T, Laurenson IF, et al. British Thoracic Society Guideline for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *BMJ Open Respir Res.* 2017 Oct;4(1):e000242.
 69. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977 Dec;74(12):5463–7.
 70. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986 Jun;321(6071):674–9.
 71. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31–46.
 72. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol.* 2012 May;30(5):434–9.
 73. Kanagawa T. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng.* 2003 Jan;96(4):317–23.
 74. Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TEA, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet.* 2012 Sep;13(9):601–12.
 75. Quail M, Smith ME, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 2012;13(1):341.
 76. Vu A, McCray PB. New Directions in Pulmonary Gene Therapy. *Hum Gene Ther.* 2020 Sep 1;31(17–18):921–39.
 77. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008 Sep 1;9(1):387–402.
 78. Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 2010 Oct;11(10):685–96.
 79. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008 Nov;456(7218):53–9.
 80. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005 Sep 15;437(7057):376–80.
 81. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature.*

- 2011 Jul;475(7356):348–52.
82. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science*. 2009 Jan 2;323(5910):133–8.
 83. Bayley H. Nanopore Sequencing: From Imagination to Reality. *Clin Chem*. 2015 Jan 1;61(1):25–31.
 84. CLSI M24: SUSCEPTIBILITY TESTING. CLSI M24: susceptibility testing of mycobacteria, nocardia spp., and other aerobic actinomycetes. Place of publication not identified: GOBI US LIBRARY SOLUTIONS; 2018.
 85. Wallace E, Hendrickson D, Tolli N, Mehaffy C, Peña M, Nick JA, et al. Culturing Mycobacteria. In: Parish T, Kumar A, editors. *Mycobacteria Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021 [cited 2025 Jan 21]. p. 1–58. (Methods in Molecular Biology; vol. 2314). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1460-0_1
 86. Ying R, Yang J, Wu X, Yu F, Sha W. Antimicrobial Susceptibility Testing Using the MYCO Test System and MIC Distribution of 8 Drugs against Clinical Isolates of Nontuberculous Mycobacteria from Shanghai. Chen X, editor. *Microbiol Spectr*. 2023 Apr 13;11(2):e02549-22.
 87. Lin G, Huang H, Sun M, He Z, Li S, Liang X, et al. Enhancing retention and permeation of rapamycin for osteoarthritis therapy using a two-stage drug delivery system. *Mater Today Bio*. 2024 Dec;29:101279.
 88. Mougari F, Bouziane F, Crockett F, Nessar R, Chau F, Veziris N, et al. Selection of Resistance to Clarithromycin in Mycobacterium abscessus Subspecies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jan;61(1):e00943-16.
 89. Özdemir H, Şimşek H, Çöplü N, Çağatay M. Percentages of Drug Resistance Detected in Nontuberculous Mycobacteria Isolated From Pulmonary Samples. *Flora J Infect Dis Clin Microbiol*. 2020 Sep 15;25(3):372–82.
 90. Da Silva Telles MA, Chimara E, Ferrazoli L, Riley LW. Mycobacterium kansasii: antibiotic susceptibility and PCR-restriction analysis of clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2005 Oct 1;54(10):975–9.
 91. Wu TS, Leu HS, Chiu CH, Lee MH, Chiang PC, Wu TL, et al. Clinical manifestations, antibiotic susceptibility and molecular analysis of Mycobacterium kansasii isolates from a university hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Sep 1;64(3):511–4.
 92. Bakula Z, Modrzejewska M, Pennings L, Proboszcz M, Safianowska A, Bielecki J, et al. Drug Susceptibility Profiling and Genetic Determinants of Drug Resistance in Mycobacterium kansasii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Apr;62(4):e01788-17.
 93. Li Y, Pang Y, Tong X, Zheng H, Zhao Y, Wang C. Mycobacterium kansasii Subtype I Is Associated With Clarithromycin Resistance in China. *Front Microbiol*

- [Internet]. 2016 Dec 26 [cited 2025 Jan 21];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02097/full>
94. Guo Y, Cao Y, Liu H, Yang J, Wang W, Wang B, et al. Clinical and Microbiological Characteristics of *Mycobacterium kansasii* Pulmonary Infections in China. Lamichhane G, editor. *Microbiol Spectr*. 2022 Feb 23;10(1):e01475-21.
 95. De Carvalho LD, De Queiroz Mello FC, Redner P, Campos CED, De Souza Caldas PC, Da Silva Lourenço MC, et al. Drug susceptibility profile of *Mycobacterium kansasii* clinical isolates from Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Dec;19:228–30.
 96. Maurer FP, Bruderer VL, Castelberg C, Ritter C, Scherbakov D, Bloemberg GV, et al. Aminoglycoside-modifying enzymes determine the innate susceptibility to aminoglycoside antibiotics in rapidly growing mycobacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2015 May 1;70(5):1412–9.
 97. Laws M, Jin P, Rahman KM. Efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* and their inhibition to tackle antimicrobial resistance. *Trends Microbiol*. 2022 Jan;30(1):57–68.
 98. Zeng J, Tan X, Gao C. Antibiotic Resistance in Mycobacteria. In: *Mycobacteria - Comparative Genomics, Biomarker Identification, Laboratory Diagnosis and Clinical Treatment [Working Title]* [Internet]. IntechOpen; 2024 [cited 2025 Jan 21]. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/1202989>
 99. Schon T, Jureen P, Chryssanthou E, Giske CG, Kahlmeter G, Hoffner S, et al. Rifampicin-resistant and rifabutin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains: a breakpoint artefact? *J Antimicrob Chemother*. 2013 Sep 1;68(9):2074–7.
 100. Shea J, Halse TA, Kohlerschmidt D, Lapierre P, Modestil HA, Kearns CH, et al. Low-Level Rifampin Resistance and *rpoB* Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*: an Analysis of Whole-Genome Sequencing and Drug Susceptibility Test Data in New York. Diekema DJ, editor. *J Clin Microbiol*. 2021 Mar 19;59(4):e01885-20.
 101. Van Ingen J. Drug Susceptibility Testing of Nontuberculous Mycobacteria. In: Griffith DE, editor. *Nontuberculous Mycobacterial Disease* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 2025 Jan 21]. p. 61–88. (Respiratory Medicine). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-93473-0_3
 102. Guo Y, Cao Y, Liu H, Yang J, Wang W, Wang B, et al. Clinical and Microbiological Characteristics of *Mycobacterium kansasii* Pulmonary Infections in China. Lamichhane G, editor. *Microbiol Spectr*. 2022 Feb 23;10(1):e01475-21.
 103. Akrami S, Dokht Khosravi A, Hashemzadeh M. Drug resistance profiles and related gene mutations in slow-growing non-tuberculous mycobacteria isolated in regional tuberculosis reference laboratories of Iran: a three year cross-sectional study. *Pathog Glob Health*. 2023 Jan 2;117(1):52–62.
 104. Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Novel Ribosomal Mutations in *Staphylococcus aureus* Strains Identified through Selection with the Oxazolidinones Linezolid and

- Torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5265–74.
105. Kadura S, King N, Nakhoul M, Zhu H, Theron G, Köser CU, et al. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed *Mycobacterium tuberculosis* drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Aug 1;75(8):2031–43.
 106. Chien JY, Chiu WY, Chien ST, Chiang CJ, Yu CJ, Hsueh PR. Mutations in *gyrA* and *gyrB* among Fluoroquinolone- and Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Apr;60(4):2090–6.
 107. Li J, Gao X, Luo T, Wu J, Sun G, Liu Q, et al. Association of *gyrA/B* mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect.* 2014 Jan;3(1):1–5.
 108. Malik S, Willby M, Sikes D, Tsodikov OV, Posey JE. New Insights into Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Functional Genetic Analysis of *gyrA* and *gyrB* Mutations. Via LE, editor. *PLoS ONE.* 2012 Jun 28;7(6):e39754.
 109. Yamamoto K, Nakata N, Mukai T, Kawagishi I, Ato M. Coexpression of MmpS5 and MmpL5 Contributes to Both Efflux Transporter MmpL5 Trimerization and Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Stallings CL, editor. *mSphere.* 2021 Feb 24;6(1):e00518-20.
 110. Zhao L, Sun Q, Liu H, Wu X, Xiao T, Zhao X, et al. Analysis of *embCAB* Mutations Associated with Ethambutol Resistance in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Apr;59(4):2045–50.
 111. Eisen DP. Doxycycline. In: *Kucers' the use of antibiotics* 2017 Oct 2 (pp. 1204-1229). CRC Press.
 112. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Jun;65(2):232-60.
 113. Wang Y, Ou X, Zhao B, Xia H, Zheng Y, Zhou Y, Xing R, Song Y, Wang S, Zhao Y, Zheng H. Genomic-based genotype and drug susceptibility profile of *Mycobacterium kansasii* in China. *Frontiers in Microbiology.* 2025 Apr 29; 16:1573448.
 114. Aragaw WW, Negatu DA, Bungard CJ, Dartois VA, Marrouni AE, Nickbarg EB, et al. Pharmacological validation of dihydrofolate reductase as a drug target in *Mycobacterium abscessus*. Silverman JA, editor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2024 Jan 10;68(1):e00717-23.
 115. Nakata N, Kai M, Makino M. Mutation Analysis of the *Mycobacterium leprae folP1* Gene and Dapsone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Feb;55(2):762–6.

116. Nurjadi D, Olalekan AO, Layer F, Shittu AO, Alabi A, Ghebremedhin B, et al. Emergence of trimethoprim resistance gene *dfrG* in *Staphylococcus aureus* causing human infection and colonization in sub-Saharan Africa and its import to Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Sep 1;69(9):2361–8.
117. Rindi L. Efflux Pump Inhibitors against Nontuberculous Mycobacteria. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 12;21(12):4191.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1665

Konu : ARASTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 20 EYLÜL 2022 SALI

Toplantı No : 2022/14

Proje No : GO 22/853 (Değerlendirme Tarihi: 20.09.2022)

Karar No : 2022/14-25

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Alpaslan ALP'nin sorumlu araştırmacı olduğu, Bio. Hakan Farzin MEHMETZADE'nin doktora tezi olan, GO 22/853 kayıt numaralı "*Mycobacterium Kansasii İzolatlarında İlaç Direnç Profili ve İlgili Gen Mutasyonları*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 21 Eylül 2022 – 21 Eylül 2023 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

- | | | |
|------------------------------------|----------|---------------------------------|
| 1. Prof. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAR | (Başkan) | 8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK |
| 2. Prof. Dr. G. Burça AYDI | (Üye) | 9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ |
| 3. Prof. Dr. M. Özgür UYA | (Üye) | 10. Doç. Dr. Merve BATI |
| 4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLE | (Üye) | 11. Doç. Dr. Gülten KOÇ |
| 5. Prof. Dr. Sibel PEHLİV | (Üye) | 12. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİ |
| 6. Prof. Dr. Tolga YILDIZ | (Üye) | 13. Av. Buket ÇINAR |

İZİNLİ

7. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN

EK-2: Tez Çalışması Dijital Makbuzu ve Orijinallik Raporu**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Hakan Farzin Mehmetzade
Ödev başlığı: Farzin Doktora Tez
Gönderi Başlığı: Farzin Tez-04-08-2025-SON.docx
Dosya adı: Farzin_Tez-04-08-2025-SON.docx
Dosya boyutu: 15.12M
Sayfa sayısı: 112
Kelime sayısı: 18,723
Karakter sayısı: 123,253
Gönderim Tarihi: 11-Ağu-2025 09:13ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2728128151



Farzin Tez-04-08-2025-SON.docx

ORIJİNALLIK RAPORU

% 16	% 14	% 10	% 9
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to University of Warwick Öğrenci Ödevi	% 4
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
3	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	Submitted to Sağlık Bilimleri Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
6	Semerci, Zeycan. "Uriner Enfeksiyon Etkeni Klebsiella pneumoniae izolatlarında Fosfomisin duyarlılığının farklı yöntemlerle saptanması", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2020 Yayın	<% 1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	turkhijyen.org İnternet Kaynağı	<% 1
9	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
10	Parviz Azimnasab-sorkhabi, Maryam Soltani-asi, Túlio Teruo Yoshinaga, Cristina de Oliveira Massoco et al. "IDO blockade negatively	<% 1

9. ÖZGEÇMİŞ