

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDEKİ KLİNİK ÖRNEKLERDE
TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKROBAKTERİ (TDM) TÜR DAĞILIMI
VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

Farhad KOHANSAL KOSHK SARAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd.Doç.Dr. Toğrul NAĞIYEV

Bu çalışma TYL-2014-2691 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

ADANA-2015

TEŞEKKÜR

Eğitim s¼rem boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen, her zaman hořg¼r¼l¼ davranan Çukurova Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Fatih K¼KSAL'a ve akademik tecr¼belerinden faydalandığım, her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Toğrul NAğIYEV'e, Çukurova Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli ğretim yeleri; Sayın Prof.Dr. F¼gen YARKIN ve Sayın Prof.Dr. Akg¼n YAMAN'a sonsuz saygı ve teřekk¼rlerimi sunarım.

Yine y¼ksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan kıvanç duyduğum, başta b¼l¼m sekreterimiz Suna G¼KMEN olmak üzere . Tıp Fak¼ltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki b¼t¼n çalışma arkadaşlarıma, ayrıca başta ğretim G¼revlisi Dr. Beg¼m KAYAR, Arş. G¼r. Dr. Taylan BOZOK, Arş. G¼r. G¼lfer YAKICI, Mehdi MARZİ, Emel YARAR ve Fırat KARSLI olmak üzere b¼t¼n T¼berk¼loz alışma Grubuna teřekk¼rlerimi sunarım.

Son olarak, hayatımın her aşamasında olduğu gibi y¼ksek lisans eğitimim s¼resince de hep yanımda olan sevgili annem Rubab TARAGIKHAH, babam Hassan KOHANSAL, abim Bahram KOHANSAL ve canım kız kardeşim Neda KOHANSAL'a, desteklerinden t¼r¼ sonsuz teřekk¼r ve sevgilerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerin Tarihçesi	3
2.2. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerin Epidemiyolojisi	3
2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	5
2.3.1. Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı ve Bileşenleri	7
2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması	8
2.4.1. <i>Mycobacterium marinum</i> (<i>M. marinum</i>)	9
2.4.2. <i>Mycobacterium kansasii</i> (<i>M. kansasii</i>)	11
2.4.3. <i>Mycobacterium szulgai</i> (<i>M. szulgai</i>)	11
2.4.4. <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> (<i>M. scrofulaceum</i>)	11
2.4.4. <i>Mycobacterium avium–intracellulare</i> kompleks (MAC)	12
2.4.5. <i>Mycobacterium ulcerans</i> (<i>M. ulcerans</i>)	12
2.4.6. <i>Mycobacterium xenopi</i> (<i>M. xenopi</i>)	13
2.4.7. <i>Mycobacterium gordonae</i> (<i>M. gordonae</i>)	13
2.4.8. <i>Mycobacterium haemophilum</i> (<i>M. haemophilum</i>)	14
2.4.9. <i>Mycobacterium fortuitum–chelonae</i> (<i>M. fortuitum</i> ve <i>M. chelonae</i>)	14
2.4.10. <i>Mycobacterium smegmatis</i> (<i>M. smegmatis</i>)	15
2.5. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerin Fizyopatolojisi	16

2.6. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerde Klinik Özellikler	16
2.6.1. Fibrokaviter Hastalık	17
2.6.2. Nodüler bronşektazi	17
2.6.3 Soliter pulmoner nodül	17
2.6.4 Hipersensitivite pnömonisi	17
2.7. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerde Tedavi	17
2.7.1. TDM'lerin Tedavisinde Kullanılan Öncelikli İlaçlar	17
2.7.1.1. Klaritromisin (CLA)	19
2.7.1.2. Moxifloxacin (MOX)	19
2.7.1.3. Doxycycline (DOX)	20
2.7.1.4. Amikacin (AMK)	20
2.7.1.5. Trimethoprim-Sulfamethoxazole (TMP-SMX)	21
2.8. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerde Tanı	21
2.8.1. TDM İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Kullanılan Biyokimyasal Testler	22
2.8.2. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerin Radyolojik Özellikleri	23
2.9. TDM İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Fenotipik Yöntemler	23
2.9.1. Mikroskopi	23
2.9.2. Kültür Ortamında İzolasyon Yöntemleri	24
2.9.2.1. İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Kart Testi ve NAP Testi	24
2.10. TDM İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi	30
3.1.1. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemi	30
3.1.1.1. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemine Hazırlık	30
3.1.1.2. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemi Uygulanışı	31
3.2. Fenotipik İncelemeler	32
3.2.1. Örneklerin Mikroskopik İncelenmesi	32

3.2.1.1. Karbol Fuksin Yöntemi (Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN))	32
3.2.1.1.1. EZN Boyasının Hazırlanışı	33
3.2.1.1.2. EZN Boyama İşlemi (ARB/AARB Boyama)	33
3.2.2. Kültür Ortamında İzolasyon	34
3.2.2.1. Lowenstein-Jensen (LJ) Agarda Kültür	34
3.2.2.2. BACTEC MGIT 960 Sisteminde Kültür	34
3.2.2.3. İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Kart Testi	35
3.2.2.4. P-Nitro- α -Asetilamino- β -Hidroksi-Propiofen/Para Nitro Benzoik Asit (NAP/p-NBA) Testi Yorumu ve Hazırlanışı	35
3.2.2.4.1. NAP/P-NBA Testinin Uygulanışı	36
3.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri (ADT)	37
3.2.3.2.1. LJ Besiyerinin Hazırlanması	37
3.2.3.2.2. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz LJ Besiyerlerinin Döküm İşlemi ve İlaç Konsantrasyonları	38
3.2.3.2.3. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz LJ Besiyerlerine Ekim İşlemi	40
3.3. TDM İzolatlarının DNA Dizi Analizi ile Genotipik İdentifikasyonu	40
3.3.1. DNA Ekstraksiyonu	40
3.3.2. Mikobakteri'lerin <i>hsp65</i> Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	41
3.3.2.1. Agaroz Jel Elektrofozi	42
3.3.2.1.1. 10xTBE Tamponunun Hazırlanması	42
3.3.2.1.2. Uygulama	42
3.3.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması	43
3.3.4. Dizi Analizi Çalışması	44
4. BULGULAR	46
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	53
7. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı	8
Şekil 2.2. Yavaş Üreyen Mikobakteri Türlerinin Sınıflandırılması	9
Şekil 2.3. Hızlı Üreyen Mikobakteri Türlerinin Sınıflandırılması	10
Şekil 3.1. Mpt64 kart testi	35
Şekil 3.2. Mickle Cihazı	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	6
Çizelge 3.1. P-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) test sonucu ve immünokromatografik TB Ag Mpt64 kart test sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi	37
Çizelge 4.1. Fenotipik incelemede TDM olarak değerlendirilen 96 suşun DNA dizi Analizi ve Agar Proporsiyon Antibiyotik Duyarlılık Test sonuçlarının karşılaştırılması	47
Çizelge 4.2. Birden fazla örneği incelenen hastalara ait sonuçların dağılımı	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
ADT	Antibiyotik Duyarlılık Testi
AMK	Amikacin
Anti-TB	Anti-Tüberküloz
APD	Agar Proporsiyon Duyarlılık
ARB/AARB	Acid-Resistant Bacilli/ Acid-Alcohol Resistant Bacilli
BCG	Bacille Calmette-Guerin
C	Sitozin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFP-10	Culture Filtrat Protein
CIP	Ciprofloxacin
CLA	Clarithromycin
DOX	Doxycycline
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü – World Health Organisation
EMB	Etambutol
ESAT-6	Early Secretory Antigenic Target
G	Guanin
GAD	Geç Tip Aşırı Duyarlılık
Hİ	Hücrel İmmünite
HIV	Human Immunodeficiency Virus-İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü (AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome-Kazanılmış Bağışık Yetmezlik Sendromu))
IU-ATLD	Uluslararası Tüberküloz ve Akciğer Hastalıklarına Karşı Birlik
İDT	İlaç Duyarlılık Testi
İNİ	İsoniazid
LAM	Lipoarabinomannan
LAP	Lenfadenopati
LJ	Lowenstein Jensen

MDR-TB	Multidrug-Resistant-TB
MGIT	Mycobacterium Growth İndikatör Tube
MHC	Major Histo-Compatibility Complex
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MIRU-VNTR	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unitvariable Number of Tandem Repeat
µl	Mikrolitre
MOTT	Mycobacterium Other Than Tuberculosis
MTBK	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex
MOX	Moxifloxacin
NALC	N-Asetil L-Sistein
NAP	p-Nitro- α -Asetilamino- β -hidroksi-Propiofen
NTM	Non-Tüberküloz
OT	Old Tüberkülin
PANTA	Polimiksin B Amfoterisin B Nalidiksik, Trimethoprim, Azlosilin asit
PAS	Para-amino salisilik asit
PIM	Fosfatidil İnozitol Mannozyd
PPD	Purified Protein Derivative-Saflaştırılmış protein derivesi
Pzase	Pirazinaminidaz
PZA	Pirazinamid
RİF	Rifampicin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism-Tek Nükleotid Polimorfizm
Spoligotyping	Spacer oligonucleotide typing
STR	Streptomycin
T	Timin
TB	Tüberküloz
Tm	Temperature Melting-Erime Eğrisi
TRM-SFX	Trimethoprim-Sulfamethoxazole
UÖRL	Ulus-Üstü Tüberküloz Laboratuvarları

ÖZET

Çukurova Bölgesindeki Klinik Örneklerde Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) Tür Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Dünyada tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM), özellikle immün sistemi zayıflamış kişilerde çevreden doğrudan bulaş yolu ile veya kolonizasyon sonucu ciddi enfeksiyonlara sebep olan mikroorganizmalardır. TDM'ler *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinden ayrımındaki zorluklar sebebi ile yanlış tanı ve tedavilere yol açmaktadırlar. Son yıllarda AIDS gibi immün sistemi zayıflatan hastalıkların insidansındaki artış ile TDM enfeksiyonlarının önemini giderek artırmaktadır.

Yapılan çalışmalarda şimdikiye kadar tanımlanmış olan 140'dan fazla TDM türünden en az 25'i hastalık etkeni olduğu, geri kalanının çevresel olduğu ve nadiren klinik örneklerden izole edildiği bildirilmiştir. Bu mikroorganizmaların üretilmesi ve fenotipik açıdan tür ayrımının yapılması oldukça zor ve zaman alıcıdır. Bu sebeple, günümüzde TDM'lerin tür ayrımında revers hibridizasyon, PCR-RFLP, DNA dizi analizi gibi moleküler yöntemler önem kazanmışlardır. Ancak, mikobakteri türleri arasında genetik yapıdaki büyük benzerlik, her geçen gün yeni bir türün keşfedilmesi ve tür içinde alt türlerin tanımlanması gibi sebepler moleküler tanıyı da büyük oranda sınırlandırmaktadır. Son çalışmalar atipik mikobakterilerin iyi korunmuş olan *Hsp65*, *16S rRNA* ve *16S-23S rRNA* gen bölgelerinin dizi analizinin tür tanımlanmasında fenotipik testlerden daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Bütün mikobakterilerde mevcut olan *hsp65* geni *16S rRNA*'ya göre daha değişken yapıya sahip olduğu için genetik olarak yakın olan türlerin tanımlanmasında daha kullanışlıdır.

Bu çalışmanın amacı Çukurova bölgesindeki TDM tür dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları belirlemek, ayrıca, kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları da irdelemektir.

Bu araştırmada Kasım 2012 – Eylül 2014 tarihlerinde Adana ve çevre illerde pulmoner tüberküloz klinik tanısı almış ve/veya şüpheli temas öyküsü olan kişilerden alınan ve *M. tuberculosis* tanısı için değerlendirilmek üzere ÇÜ THAUM ve Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen 21918 klinik örnekten izole edilen 96 TDM suşu spesifik *hsp65* gen bölgesini hedef alan DNA dizi analizi yöntemi ile tür düzeyinde tanımlandı. Klinik izolatların antibiyotik duyarlılıkları Löwenstein Jensen - Agar Proporsiyon Duyarlılık (LJ-APD) testi ile araştırıldı.

Bölgemizde en sık izole edilen TDM türünün % 24,7 ile *M. abscessus* (23/93) olduğu, TDM suşlarında en çok antimikrobiyal direncin % 17,2 ile Doxycycline ve Moxifloxacin'e (her ikisinde de 16/93) karşı geliştiği görülmüşken, en az direnç oranı Clarithromycin için % 5,4 (5/93) olarak bulundu.

Sonuç olarak, incelenen bol miktarda örnek sayısı da göz önüne alındığında, Çukurova bölgesindeki TDM tür dağılımı ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinin yanında, bölgede bilinen türlerin toplum içerisindeki hareketleri de izlenmiş oldu.

Anahtar Kelimeler: Agar proporsiyon duyarlılık (APD) yöntemi, DNA dizi analizi, *hsp65*, tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM)

ABSTRACT

Determination of Distribution and Antibiotic Susceptibility of Nontuberculous Mycobacteria (NTM) Species in Clinical Samples From The Cukurova Region

Nontuberculous mycobacteria (NTM) cause serious infections especially in immunosuppressed patients by direct transmission from the environment or after colonization around the world. Difficulties in identification of these species from *Mycobacterium tuberculosis* complex may lead false diagnosis and treatments. In recent years, increased incidence of immunosuppressing diseases as Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) have further increased the prevalence and importance of nontuberculous mycobacteria (NTM) infections.

Of the more than 140 NTM species reported in the literature, at least 25 species have been strongly associated with NTM diseases; the remainder are environmental organisms rarely encountered in clinical samples. The culturing and phenotypic identification of these bacteria at the species level is complex and time consuming. Therefore, nowadays molecular methods such as reverse hybridization, PCR-RFLP, DNA sequence analysis have gained importance. However, reasons such as great similarity of the genetic structure and identification of novel species and subspecies highly limit molecular diagnosis as well. Recent studies have exhibited, that sequence analysis of well protected gen regions such as *hsp65*, *16S rRNA*, *16S-23S rRNA* intergenic spacer region is more sensitive than phenotypic tests for the species identification. The *hsp65* gene, which is present in all mycobacteria, is more variable than the *16S rRNA* gene sequence and is therefore potentially useful for the identification of genetically related species.

The aim of this study to determine distribution and antibiotic susceptibility of NTM species in the Çukurova region. Also advantages and disadvantages of the methods will be examined.

In this study, 96 NTM strains isolated from 21918 clinical materials of patients that have pulmonary tuberculosis and/or suspected contact from Adana and the neighboring provinces have been identified to species level by DNA sequence analysis method targeting the specific *hsp65* gene region in the CU THAUM and Regional Laboratory for Tuberculosis from November 2012 to September 2014. Antibiotic resistance patterns have been evaluated by Lowenstein Jensen - Agar Proportion tests.

It was observed that the most prevalent NTM isolate was *M. abscessus* with ratio of 24,7% (23/93), and antimicrobial resistance were frequently emerged against Doxycycline and Moxifloxacin with same ratio of 17,2% (16/93), whereas lowest resistance rate was detected against Clarithromycin as % 5,4 (5/93).

In conclusion, considering the great number of the examined samples, besides determining the distribution and antibiotic susceptibility of NTM species in the Çukurova region, the movement of the known species in the population have been also monitored.

Key Words: Agar proportion susceptibility (APS) method, DNA sequence analysis, *hsp65*, nontuberculous mycobacteria (NTM).

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mycobacterium tuberculosis dışındaki mikobakterilerin (TDM; Non-tuberculous mycobacteria (NTM); *Mycobacteria other than M. Tuberculosis* (MOTT) mikroskopik inceleme ile ayırt edilmesi mümkün olmadığından, TDM ile infekte hastalarda tedavi etkisiz kalabilmektedir. TDM türlerinin büyük çoğunluğu klasik anti-tüberküloz (anti-TB) ilaçlara karşı dirençlidir. Bu durumda hem hastaya yararı olmayan bir ilacın gereksiz yere kullanılması, hem de hastanede kalış süresinin uzaması önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu sebeple tedaviye başlanmadan önce mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır¹.

Birçoğu toprakta, suda, toz taneciklerinde, evcil veya vahşi hayvanlarda, sütte ve diğer besin maddelerinde bulunmaktadır. İnsanlara çevreden bulaşabilirler veya vücut yüzeyi ve sekresyonlarında kolonize olabilirler¹⁻³. *M.tuberculosis* kompleks (MTBK) suşları dünyada hala mikobakteri enfeksiyonlarının çoğunluğundan sorumlu olmasına rağmen, TDM türlerine bağlı fırsatçı enfeksiyonlar immün sistemin zayıfladığı AIDS gibi enfeksiyonların veya sistemik bozuklukların bir sonucu olarak artış göstermektedir^{1,4,5}. Mikobakteri türleri arasında, sıklıkla TDM enfeksiyonlarında *M.avium-M.intracellulare* kompleks, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. kansasii* ve *M. xenopi* bildirilmektedir¹⁻⁶. *M. gordonae* genellikle insanda enfeksiyon oluşturmamakla birlikte klinik örneklerden kontaminant olarak izole edilmekte ve patojen türlerden ayırımı, tanı açısından önem taşımaktadır^{2,4,6,7}.

Uzun yıllar mikobakterilerin mikrobiyolojik tanımlaması geleneksel biyokimyasal testler ile yapılmaya çalışılmıştır^{1,2,8}. Bu testler gerek yoğun emek istemeleri, gerekse sık karşılaşılan TDM türlerinin çoğunun tanımlanmasında yetersiz kalmaları sebebiyle etkin olarak kullanılamamışlardır¹. Son yıllarda, otomatize sistemlerin geliştirilmesi ve klasik yöntemlerin otomatize sistemlere uyarlanması ile MTBK ve TDM ayırımı, örnek kapasitesi yüksek tüberküloz laboratuvarlarında daha etkin olarak yapılabilmektedir^{4,8,9}. Atipik mikobakteri ayırımında Bactec 460 sistemi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, önceden NCCLS) tarafından onaylanmış ve altın standart olarak kabul edilmiştir.

Daha sonra BACTEC MGIT 460 sistemi modifiye edilerek BACTEC MGIT 960 otomatize sistemi geliştirilmiştir¹⁰. Bu testin ardından TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanması için moleküler yöntemler kullanılmaktadır^{1,4,11}.

Bununla beraber çoğunun anti-TB ilaçlara doğal dirençli olduğu bildirilen TDM suşlarının antibiyotik direnç paternlerini belirlemek için maalesef standardize edilmiş bir yöntem bulunmamaktadır. Bu amaç için en çok tercih edilen yöntem olan mikrodilüsyon testi için bile gerek MİK breakpoint değerlerinin belirlenmesi gerekse hangi tür için hangi ilaç profilinin araştırılmasına karar verilmesi konusundaki zorluklar sebebiyle rutin tanı uygulamalarında TDM için Antibiyotik Duyarlılık Testi (ADT) yapılmamaktadır. Bu da MTBK/TDM enfeksiyonlarının sürveyansında aksiliklere yol açmaktadır^{1,5,6}. Bu sebeplerle biz çalışmamızda Çukurova bölgesindeki TDM tür dağılımını spesifik *hsp65* gen bölgesinin Dizi Analizi ile, antibiyotik duyarlılıklarını ise farklı TDM enfeksiyonlarının tedavisinde en çok kullanılan beş antibiotik (Amikacin, Clarithromycin, Doxycycline, Moxifloxacin ve Trimethoprim-Sulfamethoxazole) için Löwenstein Jensen - Agar Proporsiyon Duyarlılık (LJ-APD) testi ile belirlemeği amaçladık. LJ-APD yöntemi ile TDM türlerinin bu antibiyotiklere karşı duyarlılıkları daha önce birarada gerçekleştirilmemişti.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerin Tarihçesi

Tüberküloz dışı mikobakterilerin geçmişi 19.uncu yüzyıla kadar dayanmaktadır. Robert Koch'un 1882 yılında tüberküloz etkeni olarak *M. tuberculosis*'i izole etmesinden daha önce, 1868 yılında İngiltere'de tavuklarda insan tüberkülozunu taklit eden bir vaka bildirilmiştir. 1890 yılından itibaren, izole edilerek *M. tuberculosis*'den farklı bir tür olduğu tanımlanan bu bakteri sonradan *M. avium* olarak adlandırılmıştır. 1943 yılında *M. avium* kompleksinin (MAC) sebep olduğu akciğer hastalığının ilk olgularından biri olan altta yatan silikoziz hastalığı (akciğer hastalığı formu) tanımlanmıştır¹².

TDM türleri üreme hızlarına ve pigment oluşturma özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. İlk olarak 1954 yılında Timp ve Runyon tarafından bu özelliklerine göre üç grupta toplanmıştır⁵. Bunu takiben Runyon'un yapmış olduğu bir diğer çalışma ile hızlı üreyen mikobakterilerin de eklenmesi ile grup sayısı dörde çıkarılmıştır⁶.

2.2. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerin Epidemiyolojisi

Birçoğu toprakta, suda, toz taneciklerinde, evcil veya vahşi hayvanlarda, sütte ve diğer besin maddelerinde bulunan TDM türleri insanlara çevreden bulaşabilirler veya vücut yüzeyi ve sekresyonlarında kolonize olabilirler¹⁻³. Tüberküloz dışı mikobakteriyel akciğer hastalığının insidans ve prevalansının belirlenmesi konusunda problemler hala devam etmektedir. Çünkü bu hastalığın raporlanması zorunlu değildir ve her bir TDM suşunun klinik öneminin çok iyi değerlendirilmesi gerekir¹³.

Iseman ve Marras tarafından öne sürüldüğü üzere TDM akciğer hastalığının insidansı tüberküloz ile karşılaştırılabilir, ancak TDM akciğer hastalığının gerçek insidansı tüberküloz hastalığından daha yüksektir¹⁴.

Atipik mikobakterilerin sebep oldukları cilt lezyonları yavaş ilerleyen ve kendiliğinden yavaş olarak gerileme özelliği gösteren enfeksiyonlardır. Ancak *M. ulcerans* ve *M. scrofulaceum*'un sebep olduğu enfeksiyonlar oldukça yıkıcı ve derin cilt enfeksiyonları şeklinde gözlenebilmektedir. Bununla beraber, *M. kansasii*, *M. szulgai* veya

M. fortuitum *M. chelonae* kompleksine bağı gelişen enfeksiyonlar tendon ve kemik dokuya kadar ilerleyerek eradikasyonu oldukça güç klinik durumlar ortaya çıkarabilmektedir. Son yıllarda transplantasyon cerrahisinin ve iyatrojenik olarak oluşturulan immunsupresyon tablolarının artması ile birlikte *M. haemophilum*, *M. xenopi*, *M. avium–intracellulare* kompleks ve *M. marinum*'un sebep olduğu enfeksiyonlarda da artış gözlenmektedir¹³. Bu derlemede özellikle immüsupressif hastaların insidansındaki artışa bağı olarak son yıllarda daha sık gözlenen atipik mikobakteriyel enfeksiyonların kutanöz bulguları ve tedavi yöntemleri irdelenmiştir⁷.

TDM'lerde son 3 yıldır hem laboratuvar izolasyonu hem de hastalığın prevalansı gittikçe artmaktadır. Bu değışim gelişmiş kültür teknikleri, hastalığın farkındalığı ve hastalığın prevalansında da doğıru bir artışa kısmen katkı sağlamıştır. Fakat, organizmanın izolasyonu klinik enfeksiyon evrensel bir gösterge olmadığı için TDM akciğer enfeksiyonlarının insidans ve prevalansını doğıru bir şekilde karakterize etmek zordur. Buna ek olarak TDM enfeksiyonlarında TB'nin aksine halk sağılığı raporlarına gereksinim duyulmaz ki bu durum epidemiyolojinin tam olarak anlaşılmasını engeller. Üstelik tüm epidemiyolojik veriler Amerika, Japonya ve Avrupa'dan rapor edilmiştir. Sonuç olarak; bu durum dünya çapındaki prevalans değışikliğini yansıtmayabilir¹⁵.

Benzer kültür teknikleri kullanıldığı zaman, çevresel örnekler çeşitli coğrafik bölgelerde benzerdir. Batı toplumlarında, çoğı laboratuvarlar TDM prevalansının kayda değıer bir şekilde arttığını rapor eder. Fakat, tüm pozitif TDM kültürleri enfeksiyonu göstermez. Son analiz pozitif TDM solunum kültürleriyle bunların yaklaşık yarısının aktif enfeksiyon için klinik kriter olabileceğini gösterdi¹⁵.

Kendall ve Winthrop'un derlemesinde Laboratuvar kayıtlarına dayalı TDM akciğer enfeksiyonlarının prevalansı yılda 100.000 hastada 4.1 ila 14.1 arasında değışik klinik özellikleri ile eşlik etmektedir. 65 yaş üstü hastalarda prevalans yıllık 100.000 hastada 47 dir. Hastalığın prevalansı yaşla artmakta, kadınlarda erkeklere nazaran TDM hastalığı olma olasılığı daha yüksek olmakta ve bu prevalans Batı ve Güneydoğı'da daha yaygın bir şekilde görülmektedir. Amerika'da vakaların yüzde 90'mı beyazlar oluştururken diğıerleri Asya/Pasifik adalılar ve siyahilerde görünmekte¹⁵.

2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Tüberküloza sebep olan mikroorganizma prokaryot (bakteri) kingdomu, *firmicutes* phylumu *actinobacteria* classının *Actinomycetales* ordosu içinde yer alan *Mycobacteriaceae* familyasının *Mycobacterium* cinsine ait *M. tuberculosis* türüdür¹⁶. Genellikle hücre içi yerleşim gösterip, hücresel immün cevap ve geç tipte hipersensitivite reaksiyonu sonucu granümatöz tipte infeksiyonlara sebep olurlar¹⁷.

Mikobakteriler katalaz aktifliği gösteren (bazı türleri), aerop, sporsuz, hareketsiz, kapsülsüz, aside dirençli, silindirik, hafif kıvrık veya düzgün şekilde kord oluşturabilen, 0.3-0.6 µm eninde, 1.0-10 µm boyunda ince basillerdir. Bölünme süreleri 12-18 saat olup yavaş üreyen, pleomorfik çomaklardır. Optimum üreme şartları 5-6 pH ve %5-10 CO₂'dir. 37°C üreme için uygun bir sıcaklık olmasına karşın bu sıcaklık türden türe değişmektedir. Uygun şartlar altında 10-15 günde koloniler gözle görülmeye başlar¹⁸. *M. tuberculosis* ve *M. bovis* 2 haftadan çok, *M. avium* ve *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans* 1 haftadan çok, *M. fortuitum*, *M. chelonae* türleri ise 1 haftadan daha az bir sürede üreme gösterebilirler¹⁹ (Çizelge 2.1).

Ailenin tek genusu *Mycobacterium*'dur. Bu genus içerisinde yer alan mikroorganizmalar çok farklı özelliklere sahiptir. Bazı mikobakteriler toprak ve suda vinilylklorid ve phenanthrene gibi recalsitran organik bileşikleri degrade ederek, steroidler ve düşük alkalenlerin optikal aktif oksidlerini üretirlerken, bazıları da yüksek vertabralı hayvanlarda ölümle sonlanabilen hastalıklara sebep olan intrasellüler patojenlerdir. İnsanlarda infeksiyon oluşturan türleri ile mikobakteriler tüm dünyada önlenebilir ölümlerin en önemli sebepleri arasında yer alan tüberküloza sebep olurlar¹⁶.

Çizelge 2.1. Mikobakterilerin genel özellikleri¹⁷.

Türler	Mikobakterilerin Genel Özellikleri																		
	Üreme Dereceleri ^a °C				Koloni		Niacin	T ₂ H ₂ ya Duyarlılık	Nitrat Redüksiyonu	Yarı Kantitatif Katalaz	68°C Katalaz	Tween Hidrolizi	Tellürit Redüksiyonu	%5 NaCL'ye direnç	Demir Alımı	Aryl Sulfataz	McConkey Agarda üreme	Üreaz	Pyrazinamidase
	45	37	31	24	Tipi ^b	Pigment ^c													
<i>M. tuberculosis</i>	-	Y ¹	Y	-	R ¹	-	+	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	+	+
<i>M. bovis</i>	-	Y		-	R	-	-	+	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	+	-
<i>M. kansasii</i>		Y	Y	Y	S/R ²	F ¹	-	-	+	+	+	+	-/+	-	-	-	-	+	-
<i>M. marinum</i>		-/+	O ²	O	S/R	F	-/+	-	-	-	-	+	-/+	-	-	-/+	-	+	-
<i>M. ulcerans</i>	-	-	Y	-	R	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. simiae</i>		Y			S	F	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>M. scrofulaceum</i>		Y	Y	Y	S	Sk ²	-	-	-	+	+	-	-/+	-	-	D	-	+	+/-
<i>M. szulgai</i>		Y	Y	Y	S/R	Sk/F	-	-	+	+	+	-/+	-/+	-	-	D	-	+	+
<i>M. gordonae</i>		Y	Y	Y	S	Sk	-	-	-	+	+	+	-	-	-	D	-	-	-/+
<i>M. xenopi</i>	Y	Y			S	Sk	-	-	-	-	+	-	-/+	-	-	+	-	-	D
<i>M. avium-intracellulare</i>	-/+	Y		-/+	S/R	-	-	-	-	-	-/+	-	+	-	-	-	-/+	-	+
<i>M. gastri</i>		Y		Y	S/R	-	-	-	-	-	-	+	-/+	-	-	-	-	+	-
<i>M. malmoense</i>		Y	Y	Y	S	-	-	-	-	-	+/-	+	+	-	-	-	-	D	+
<i>M. haemophilum</i>			Y	Y	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. nonchromogenicum</i>		Y		Y	S/R	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	D	-	D
<i>M. terrae</i>		Y		Y	S/R	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	D	-	D
<i>M. triviale</i>		O		Y	R	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-/+	-	-	D
<i>M. fortuitum</i>	-	Ç ³		Ç	S/R	-	-	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. chelonae</i>		Ç		Ç	S/R	-	D	-	-	+	D	D	+	D	-	+	+	+	+
<i>M. phlei</i>	Ç	Ç		Ç	R	Sk			+	+	+	+	+	+	+	-	-		
<i>M. smegmatis</i>	Ç	Ç		Ç	S/R	-			+	+	+	+	+	+	+	-	-		
<i>M. vaccae</i>		Ç		Ç	S	Sk			+	+	+	+	+	D	+	-	-		

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

Guanin ve sitozin (G+C) (%62-70) oranının yüksek olması ile mikolik asit içeren diğer bakterilere; *Nocardia* (%60-69), *Rhodococcus* (%59-69), ve *Corynebacterium*'lara (%51-59) benzerler. Mikobakterilerle ilgili yapılan çalışmalar *M.tuberculosis*, *B.bovis* ve *M. lepra* türlerinin gen analizlerinin yapılmasından sonra hız kazanmış, bakterinin fizyolojik biyokimyasal antijenik ve genetik özellikleri hakkındaki bilgilerimiz daha da berraklaşmış, bu bilgilerin ışığında yeni profilaksi ve tedavi çalışmaları hız kazanmıştır.

Yapılan gen analizleri Mikobakterilerin genomunun *B.subtulis* ve *E.coli* gibi kolay ve hızlı üreyen bakterilere göre daha küçük olduğunu göstermiştir. *M.tuberculosis* H37Rv suşunun gen büyüklüğü 4.411.529 bp olup yaklaşık olarak 3.986 proteini kodlamaktadır¹⁶.

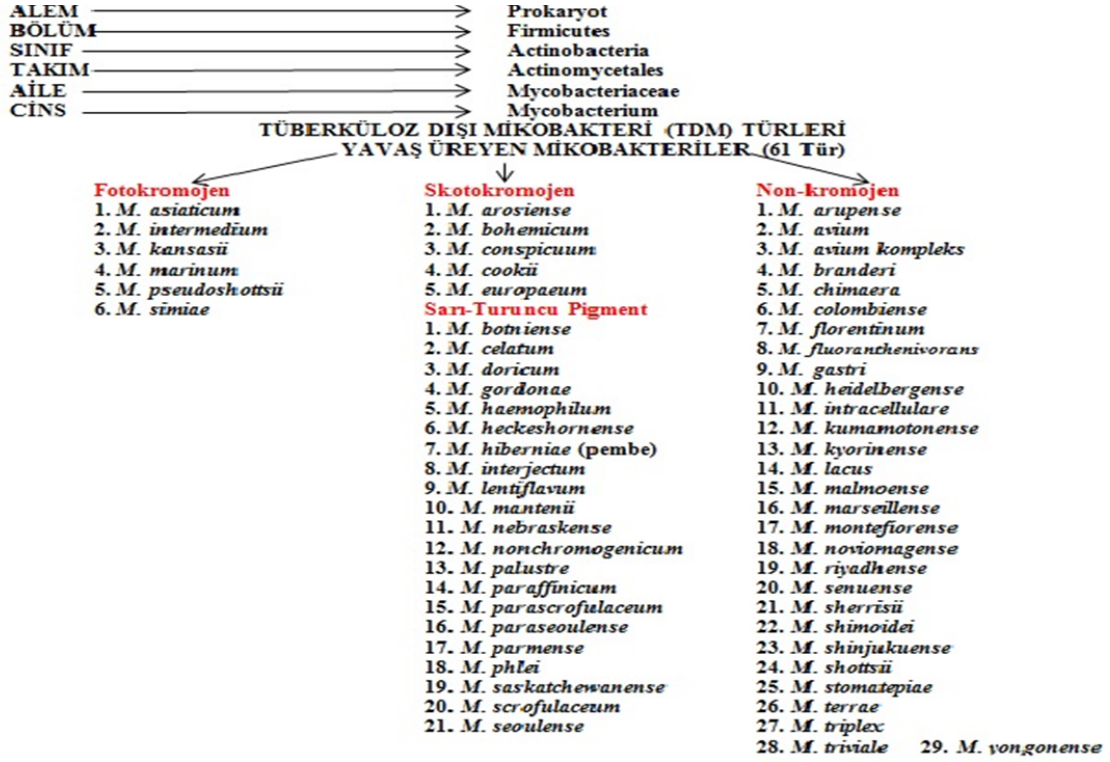
2.3.1. Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı ve Bileşenleri

Mikobakterilerin duvar yapısı da temelde diğer bakteriler gibidir. N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitin polimeri olan peptidoglikan (mürein) iskeleti oluşturur. Mikobakterilerde daha spesifik olan, lipopolisakkarit yan zincirlerdir. Lipopolisakkaritler, arabinose ve galaktozdan oluşan dallı bir polisakkarit olan arabinogalaktan'dan yapılmıştır. Arabinogalaktan, mikobakteri'lerin yanı sıra *Corynebacterium*'de ve *Nocardialar*'da da bulunur. Arabinogalaktan, peptidoglikan'a fosfodiester köprüleri ile bağlıdır. Arabinogalaktanların yan zincirlerindeki üç arabinose birimlerine mikolik asit diye adlandırılan bir grup uzun zincirli yağ asitleri kovalent bağlarla bağlanırlar. Yaklaşık 70 karbon atomu içeren bu yağ asitleri hücre duvarının kalınlığından ve bir ölçüde de hücrenin aside dirençli olmasından sorumludurlar^{20,21}.

Mikobakterilerin dış tabakasında ise polisakkarit ve proteinlerden az miktarda da lipidlerden oluşan yapı yer almaktadır. Bu yapılar içerisinde alfa-1,4 glukon, bir arabinomannan ve mannan içeren lipomannan ve lipoarabinomannan gibi kapsüler polisakkaritler son derece önem arz eder. Mikobakterilerin hücre duvarında gram negatif bakterilerde olan porin proteinleri de bulunur^{21,22} (Şekil 2.1).

Hücre duvarının dış tabakasında yukarıda söz edilenlerin dışında daha bir çok kompleks moleküller bulunmaktadır. Bunların arasında *M. tuberculosis* ile infekte edilmiş makrofaj kültürlerinde fagolizozom füzyonunu engellediği için virulansta rol oynadığı düşünülen sülfatidler ve sulfated acyl trehalose'lar vardır²³. Eskiden sadece virulan suşlara özgü olduğu düşünülen, bir trehalose dimyecolate olan "cord faktörü'nün bütün mikobakteri türlerinde olduğu gösterilmiştir. En dış tabaka, peptidoglikolipidlerden ya da phenol-phthiocerol glycoside'lerden oluşan ve "mycosides'ler olarak adlandırılan bir yapıdır²⁰.

Hücre duvarı, kuvvetli tüberkülin benzeri reaksiyon veren proteinler ve peptidler de içerir. Hücre duvarının kalınlığından ve çok miktarda lipid içermesinden (hücre duvarının

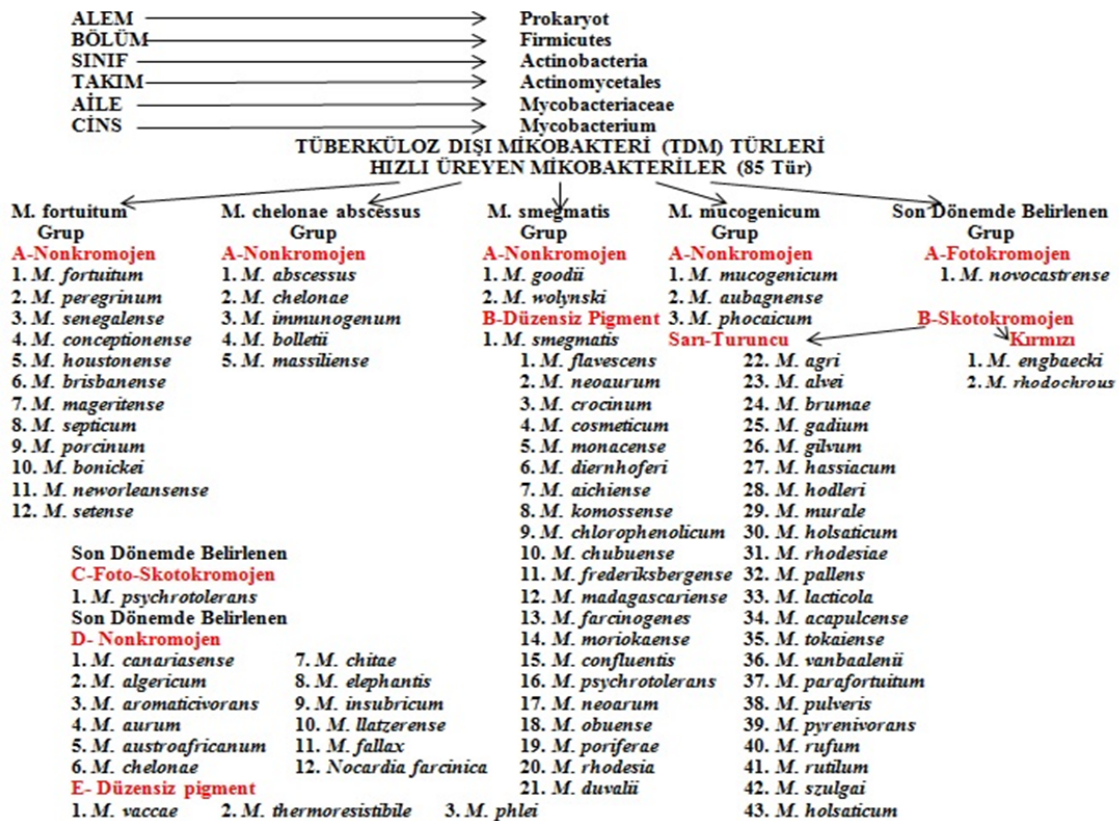


Şekil 2.2. Yavaş Üreyen Mikobakteri Türlerinin Sınıflandırılması^{19,25,26}.

2.4.1. *Mycobacterium marinum* (*M. marinum*)

Yüzme havuzu granülomu, akvaryum granülomu veya balıkçı parmağı gibi tabloların etkeni olarak kabul edilmektedir. Atipik mikobakteriyel enfeksiyonlar içinde cilt enfeksiyonlarına en sık sebep olan etkidir. Özellikle körfez, liman ve kıyı suları gibi ılık, tuzlu sularda bulunmaktadır. İnsanlara bulaş, bütünlüğü bozulmuş cildin kontamine su veya deniz ürünleri ile temas etmesi sonucunda olmaktadır²⁷. İnsandan insana bulaş henüz raporlanmamıştır. Epidemiler ise özellikle kontamine olmuş aynı yüzme havuzunu kullanan kişiler arasında gözlenmektedir²⁸. Kontamine olmuş cilt bölgesinde inkübasyon döneminde gelişen hiperemi, hassasiyet ve endurasyonu takiben multipl papülonodüler kahverengi lezyonlar gözlenmektedir. Bu lezyonlar daha sonraki dönemlerde drene üllerle ilerleyebilirken psöriyazisi andıran plaklar şeklinde de olabilmektedir. Sıklıkla suların daha sık temas ettiği el bileği, diz, eller ve ayaklarda gözlenirken bursa, kemik ve sinovyal dokuya kadar ilerleyen enfeksiyonlara da yol açabilir. Sistemik yayılım ise immünkompromize ve immünkompetan hastalarda yaklaşık olarak %2 oranında

gözlenmektedir²⁹. Ayırıcı tanıda sporotrikoz, nokardiyoz, blastomikoz, kromoblastomikoz, diğer mikobakteriyel etkenler, kutanöz leşmanyaz, koksidiyomikoz, tularemi ve yabancı cisim granülomu düşünülmelidir. Tanıda kültür ve histopatoloji önemli yer tutmaktadır. Histopatolojik olarak kazeifiye olmayan granülomatoz lezyonlar gözlenirken, erken dönem biyopsilerin sadece %10'unda aside dirençli bakteri gözlenebilmektedir³⁰. Kültür için Middlebrook 7H10, 7H11 ve antibiyotikli Lowenstein-Jensen besiyerleri kullanılır. Bu kültürlerde 7-10 gün içinde gözlenen üreme koyu renkli pigmente olmayan koloniler şeklindedir. Bunu takiben ise 24-48 saat içinde sarı renkte pigmentöz koloniler gözlenebilir. Tek cilt lezyonları 6-36 ay içinde kendiliğinden gerileme gösterebilirken bazı enfeksiyonlar 45 yıla kadar varlığını sürdürebilir³¹. Lokalize *M. marinum* enfeksiyonlarının tedavisinde minosiklin (2×100 mg), doksisisiklin (2×100 mg), trimethoprim-sulfamethoksazole (2×160/800 mg), rifampisin (600 mg/gün), klaritromisin (2×500 mg) ve siprofloksasin (2×500 mg) önerilen ajanlardır³².



Şekil 2.3. Hızlı Üreyen Mikobakteri Türlerinin Sınıflandırılması^{19,25,26}.

2.4.2. *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*)

Özellikle iyi klorlanmamış musluk sularında bulunmaktadır. Bununla birlikte öküz ve domuz gibi hayvanlarda da belirlenmiştir. En sık inhalasyon sonucu pulmoner enfeksiyonlar gözlenirken, cilt enfeksiyonları çok daha nadirdir. Cilt enfeksiyonları özellikle immunsuprese hastalarda normal veya bütünlüğü bozulmuş cilt dokusunda gelişmektedir. Yaklaşık olarak 15 günlük inkübasyon dönemini takiben gözlenen cilt lezyonları kırmızı renkli papül veya plaklar; püstüler, ülsere, kabuklu veya verrükoz papül veya nodüller; sellülit ve apse tabloları şeklinde gözlenebilir. Lezyonların histopatolojik incelemesinde akut ve kronik inflamasyon bulgularının yanı sıra tüberküloid veya epiteloid granülomlar mevcuttur. Kültür için Lowenstein-Jensen besiyerinin 37°C’de en az 10-20 gün süre ile inkübasyonu gereklidir. Kültür sonucunda sarı portakal rengi beta karoten kristalleri içeren pigmentler gözlenebilir. Tedavide rifampin 600 mg/gün, izoniazid 300 mg/gün, etambutol 15 mg/kilogram/gün kullanılmaktadır³³. Tedavisiz olgularda kendiliğinden gerileme gözlenebilirken, bu gerilemenin oldukça yavaş olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir³⁴.

2.4.3. *Mycobacterium szulgai* (*M. szulgai*)

Doğadaki konakçısı tam olarak tespit edilememiş bir atipik mikobakteridir. Pulmoner enfeksiyonlar en sık olmak üzere, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep olmaktadır. Cilt lezyonları ekstremitelerde ve gövdede kırmızı hassas nodüller şeklinde olup spontan olarak drene olabilir³⁵. Bu lezyonlar ilerleyerek subkutan ve kemik dokuyu enfekte edebilir³⁶. Bu hastalarda histopatolojik olarak kazeifiye olmayan granülamatöz lezyonlar bulunurken, kültürleri diğer atipik mikobakterilere benzemektedir. Tedavide izoniazid (300 mg/gün), rifampin (600 mg/gün) ve ethambutol (1.200 mg/gün) uzun süreli kullanılmalıdır³⁷.

2.4.4. *Mycobacterium scrofulaceum* (*M. scrofulaceum*)

Özellikle çocukluk çağında yol açtığı servikal lenfadenopati sebebiyle “scrofulaceum” olarak isimlendirilmiştir. Doğada toprakta, musluk sularında, çiğ sütte ve birçok süt ürünlerinde bulunabilmektedir. İnsanlara bulaş açısından oral, orofarengeal ve

hematojen yayılımın etkili olduğu düşünülmektedir. *M. scrofulaceum* enfeksiyonu çocukluk çağında daha sık olmak üzere erişkinlerde de tek taraflı hassas servikal lenfadenopati ile seyretmektedir. Bu lenf nodu kendiliğinden drene olabilmekle beraber multipl dağınık paternde subkutanöz apselere de sebep olabilmektedir. Cilt tutulumunun yanı sıra pulmoner tutulum, dissemine hastalık tablosu, konjunktivit, menenjit, granülamatoz hepatit ve osteomyelit tablosu gözlenebilir. Tedavide cerrahi olarak lenf nodunun çıkartılması önerilmekle birlikte, oral olarak rifampisin ve izoniazid kombinasyonu kullanılmalıdır. Tedavi süresi 9 ay olarak belirtilmektedir³⁷.

2.4.5. *Mycobacterium avium–intracellulare* kompleks (MAC)

Son yıllarda özellikle AIDS (Acquired Immun Deficiency Syndrome) hastalarında artan oranlarda cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep oldukları gözlenmektedir. Babalık ve ark.'nın ülkemizde yapmış oldukları çalışmada atipik mikobakteriler arasında ikinci sırada enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmışlardır³⁸. Toprakta, tuzlu ve temiz sulara, hayvan yemlerinde ve bazı bitkilerde bulunabilmektedir. Bununla beraber aerosol şeklinde havada asılı olarak da kalabilmektedir. Sağlıklı kişilerde herhangi bir enfeksiyon etkeni değil iken, immünkompromize hastalarda özellikle de AIDS hastalarında önemli bir solunum yolu enfeksiyonu etkenidir. Cilt lezyonlarında özellikle bu hasta grubunda çok daha sık gözlenmektedir. Bu lezyonlar başlangıçta kırmızı renkli plaklar şeklinde veya ülseratif lezyonlar şeklindedir. Bu lezyonların disseminasyonu sonucunda granülomlar, ülserler, püstüller ve yaygın lenfadenopati tabloları gelişebilir³⁹. Tedavide önerilen rejim özellikle makrolid antibiyotiklerin eklendiği kombinasyon tedavileridir. Bu kombinasyonda klaritromisin, rifampisin ve etambutolun yanı sıra streptomisin de kullanılabilir³³.

2.4.6. *Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*)

Bu mikroorganizmaya bağlı oluşan hastalık tabloları birkaç farklı isimde anılmaktadır. Bunlar buldukları coğrafi bölgeye göre değişmekle beraber Buruli ülseri, Kakerifu ülseri, Bairnsdale ülseri, Searls' ülseri veya Kumusi ülseri olarak isimlendirilir. Özellikle Uganda ve Zaire gibi tropikal ve subtropikal bölgelerde sıklıkla gözlenmektedir.

Lezyonlar özellikle ekstremitelerde karşımıza çıkmakla beraber küçük eritematöz lezyonlardan başlayarak ilerleyici nekrotik ve ülseratif lezyonlara da dönüşebilmektedir. Özellikle immünsüpressif hasta grubunda bu lezyonlara yol açabileceği unutulmamalıdır. Tedavide klaritromisin ile rifampisin kombinasyonunun kullanılması önerilmekle beraber son yıllarda yapılan çalışmalarda bir kinolon olan siprofloksasinin de rifampisin ile kombinasyonunun oldukça başarılı olabileceği gösterilmiştir⁴⁰.

2.4.7. *Mycobacterium xenopi* (*M. xenopi*)

Bu atipik mikobakteri ilk olarak Schwabacher tarafından 1959 yılında ‘Xenopus laevis’ isimindeki kurbağalardan izole edilmiştir⁴¹. Bunun ardından birçok ülkede sıcak su hatlarından ve doğal su kaynaklarından izole edilmiştir⁴². İnsanlara bulaşın çevreden aerosollerin inhalasyonu veya sindirimi ile olduğu düşünülmeyle birlikte insandan insana bulaş kanıtlanamamıştır⁴³. Bu mikobakteriyel enfeksiyonun cilt tutulumu özellikle altta yatan bir kemik veya yumuşak doku tutulumu durumunda ortaya çıkabilmektedir. Cilt tutulumunda diğer atipik mikobakteriyel enfeksiyonlara benzer iken, histopatolojik olarak ise epitelooid makrofajlar, Langhan’s tipi dev hücreler gözlenebilmektedir. Üreme özellikleri olarak ise 42-43 °C’de sarı renkli pigment oluşturan koloniler şeklinde gözlenir. Korunma yöntemleri içinde özellikle immünkompromize hasta grubunda sık olarak tespit edilmesi sebebi ile hastanelerin sıcak su kaynaklarının kontrollerinin sağlanması çok önemli yer tutmaktadır. Tedavide ise izoniazid, rifampisin, etambutol ve streptomisin kombinasyonu kullanılmaktadır⁴⁴.

2.4.8. *Mycobacterium gordonae* (*M. gordonae*)

Su basili, musluk suyu basili veya musluk suyu skotkromojeni gibi isimlendirmeler ile anılır. Bu mikroorganizma özellikle sulu ve çamurlu bölgelerde, su kaynaklarında ve yüzme havuzlarında sıklıkla gözlenebilmektedir⁴⁵. Zaman zaman bu kaynaklar dışında özellikle rat ısırıkları gibi hayvan ısırıkları da cilt enfeksiyonları sebebi olabilmektedir. Cilt enfeksiyonları hassas ve boyutu 0,5-1,5 cm arasında değişebilen papülönodüler lezyonlar şeklinde gözlenebilirken, bu lezyonların yüzeyi ülseratif hal alabilir⁴⁶. Bunu takiben lokalize lenfadenit tablosu da eklenebilir. Histopatolojik olarak ise geniş histiyositler,

multinükleuslu dev hücreler, akut ve kronik inflamasyon bulguları tespit edilebilir⁴⁷. Üremesi için yaklaşık 4-8 hafta gibi uzun bir süre gerekli olup, koloniler sarıportakal rengindedir. Optimal üreme ısı ise 37°C'dir. Kültür için özellikle pH'sı 6 olan Ogawa besiyeri kullanılmaktadır. Tedavide oral rifampisin'in (300 mg/gün) 6 ay süre ile veya trimetoprim-sulfametoksazol (2×320 mg/1600 mg) ile etambutol (800 mg/gün) kombinasyonunun 24 ay süre ile kullanılması önerilmektedir⁴⁶.

2.4.9. *Mycobacterium haemophilum* (*M. haemophilum*)

Özellikle lenfoma veya renal transplantasyon gibi lenfopenik hastalarda daha sık gözlenmektedir⁴⁸. Cilt lezyonları özellikle ekstremitelerde multipl lokalizasyonda gözlenen kırmızı parlak renkli papüller şeklinde ortaya çıkarken ilerleyerek hassas ülsere nodul veya abse şekline dönebilmektedir. Histopatolojik olarak polimorfonükleer infiltrat ile beraber granülatöz pannikülit tablosu gözlenirken, Langhan's tipi dev hücreler ve non kazeifiye nekroz da belirlenebilir. Üremesi için kültür ortamında hemoglobin veya hemin gerektirmektedir. Bunun için koyun kanlı agar, çikolatamsı agar veya %2 ferrik amonyum sitratlı Lowenstein-Jensen besiyerleri kullanılmaktadır. 21 Non pigmente koloniler 2-4 hafta içinde tespit edilebilmektedir. Tedavide izoniazid ve rifampisin kombinasyonu kullanılmaktadır⁴⁸.

2.4.10. *Mycobacterium fortuitum* (*M. fortuitum*) ve *Mycobacterium chelonae* (*M. chelonae*)

M. fortuitum ve *M. chelonae*, *mycobacterium* cinsinin farklı türleri olmasına rağmen, hem kültür özelliklerinin benzer olması hem de oluşturduğu klinik tabloların benzer olması sebebi ile eskiden aynı grupta sınıflandırılıyorlardı. Bu mikroorganizmalar doğada toprakta, hidroterapi havuzlarında, su kaynaklarında, musluk sularında, cerrahi kaplarda ve hatta laboratuarlarda bulunan distile su kaynaklarında bulunabilmektedir. Bu grubun enfeksiyonları özellikle travma, kardiyovasküler cerrahi, intravasküler kateter yerleştirilmesi gibi invaziv girişimlerden sonra gözlenebilir. Kızarıklık ve hassasiyet genellikle ilk bulgu olarak tespit edilirken 3-4 haftalık bir inkübasyonu takiben karşımıza çıkabilir. Bunu takiben soğuk abseler ve drenaj gözlenebilir³⁹. Bazı durumlarda travmaya

uğramış veya cerrahi uygulanan bölgedeki enfeksiyonun disseminasyonu sonucunda kırmızı kahverenkli hassas olmayan subkutan nodüler lezyonlar gözlenebilir⁴⁹. Aynı zamanda drene olabilen soliter lenf nodları, postoperatif endokardit, osteomyelit ve kronik pulmoner hastalık tabloları da gözlenebilmektedir. Histopatolojik olarak granülamatöz inflamasyon, nekroz ve dev hücreler gözlenebilir. *M. fortuitum*, *M. chelonae* enfeksiyonu tedaviye rağmen % 10-20 olguda persistan olarak kalabilmektedir. Dissemine hastalık tablosunda ise mortalitesi %10-20'yi bulabilmektedir⁵⁰. Tedavide cerrahi drenaj ile birlikte medikal tedavide, doksisiklin, siprofloksasin veya amikasin kullanılabilir³⁹.

2.4.11. *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*)

Bu mikroorganizmaya bağlı gelişen cilt enfeksiyonları ilk olarak kardiyak cerrahiye takiben tanımlanmıştır. Cerrahi, travma veya diğer invaziv prosedürler bu organizma için en önemli risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. Sellülit, yara etrafında drene olabilen hiperemik apse lezyonları en sık karşılaşılan cilt enfeksiyonu tablolarıdır. Histopatolojide spesifik olmayan nekroz, dev hücreler ve polimorfonükleer hücrelerin bulun-duğu miks inflamatuvar infiltrat tabloları gözlenebilir. Kültür için en uygun besiyeri Middlebrook 7H10 agardır ve 43-45 °C' de 7 günden daha kısa süre içinde üreme gözlenmektedir. *M. smegmatis* kolonileri üreme özellikleri açısından *M. fortuitum* kolonilerine çok benzemektedirler. Ayrımında ise *M. smegmatis*'in arilsülfataz testine yanıtızsız olması, katalaz testine daha az duyarlı olması ve en iyi 45 °C'de üremesi kullanılmaktadır⁵¹. Tedavide doksisiklin, trimetoprim-sulfametoksazol, siprofloksasin ve amikasin kombinasyonuna çok iyi yanıt vermektedir⁵². TDM türlerine bağlı gelişen cilt enfeksiyonları özellikle son yıllarda immünsüpressif hasta grubundaki artışa paralel olarak daha sık gözlenmeye başlamıştır. Bununla birlikte Aydın ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada TDM türlerinin süt gibi hayvansal gıdalardan oldukça yüksek oranda izole edilmesi sebebi ile insana geçiş riskinin daha da arttığı gösterilmiştir. Bu sebeple, hekimler tarafından özellikle bu hasta grubunda gözlenen cilt lezyonlarında çok daha dikkatli davranılmalı, gerekli biyopsi ve kültür örnekleri zamanında alınarak laboratuvara gönderilmeli ve enfeksiyonun primer odağı mutlaka araştırılmalıdır.

2.5. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerin Fizyopatolojisi

Tüberküloz dışı mikobakterilere bağlı akciğer hastalığının en temel kaynağı çevre olup özellikle belediye su kaynaklarında oluşan mikrofilm tabakası, TDM'ye bağlı oluşan akciğer hastalığındaki en önemli bulaşma yollarından birini oluşturmaktadır. Su yüzeyindeki bu tabaka besinlerle birlikte nemli ve sıcak bir çevre oluşturarak TDM dâhil birçok patojen organizmaların gelişmesine sebep olmaktadır⁵³.

Bronşektazi ve TDM enfeksiyonu çok sık ilişkisi olan iki durumdur. Kistik fibrozisli hastaların %20'sinde ve primer siliyer diskinezi olgularının %15'inde TDM enfeksiyonu olması TDM enfeksiyonunun solunum yolu yüzey savunma defektleriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir⁵⁴ Kim ve ark. son zamanlarda TDM akciğer hastalığı olan 63 hastada karakteristik bir morfoloji (%95 kadın, %91 beyaz, %68 hiç sigara içmemiş) rapor etmişlerdir. Bu seçilmiş grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında beden kitle indeksi (BKİ) anlamlı derecede düşük bulunurken boy daha yüksek belirlenmiştir¹³. Aynı zamanda bu grupta skolyoz (%51), pectus excavatum (%11), mitral valv prolapsusu (%9) ve kistik fibrozis transmembran conductance regülatör gen (CFTR) (%36) yüksek oranlarda bildirilmiştir¹³.

Bu morfolojik özelliklerin patogenetik sebepleri henüz bilinmemektedir. Ancak bir kısım hasta bize TDM akciğer hastalığının patogenezi hakkında ipuçları verebilir. Tüberküloz hastalığında olduğu gibi tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) blokerleri TDM akciğer hastalığı gelişiminde çok potent ve yeni predispozan faktörlerdendir. Winthrop ve ark. son zamanlarda yayınladıkları raporda %65 kadın, yaş ortalaması 62 ve büyük bir kısmı romatoid artrit olan bir hasta grubunda TNF α blokeri alanlarda TDM hastalığını anlamlı derecede yüksek belirlemişlerdir⁵⁶. En sık bulunan ajan MAC iken %44 oranında akciğer dışı tutulum gözlenmiş, %9 oranında da mortalite bildirilmiştir. Dolayısıyla TDM'ye bağlı akciğer hastalığı olan ya da şüphelenilen olgularda TNF α blokeri verilirken çok dikkatli olmak gerekmektedir¹³.

2.6. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerde Klinik Özellikler

Tüberküloz dışı mikobakterilere bağlı akciğer hastalığını 4 temel paternde inceleyebiliriz⁵⁷.

2.6.1. Fibrokaviter Hastalık

Bu patern klasik olarak sigara ve alkolizm öyküsü olan orta yaşlı erkek hastalarda görülür. Daha çok üst loblar tutulur ve genellikle KOAH, sekel tüberküloz ve silikozis gibi altta yatan predispozan bir faktör vardır. Hastalığın bu formu MAC, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense* ve hızlı büyüyen mikobakteriler ile ilişkilidir⁵⁷.

2.6.2. Nodüler bronşektazi

Bu patern genellikle sigara içmeyen, yaşlı ve altta herhangi bir akciğer hastalığı olmayan bayanlarda görülür. Ancak bu hastalarda kifoz, skolyoz ve pectus excavatum gibi toraks deformitelerine rastlanabilir⁵⁷.

2.6.3 Soliter pulmoner nodül

Tüberküloz çok benzer bir şekilde ortaya çıkar. Karsinomdan mutlaka ayırıcı tanısının yapılması gerekir⁵⁸.

2.6.4 Hipersensitivite pnömonisi

Son yıllarda MAC enfeksiyonuna bağlı sıcak küvet akciğeri veya jakuzi akciğeri (hot tub lung) olarak adlandırılan bir tablodur. Daha önce herhangi bir akciğer hastalığı olmayan sağlıklı bireylerde görülebilir. Olguların ortamdaki çıkarılmasıyla spontan olarak veya steroid tedavisiyle geriler⁵⁹.

2.7. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerde Tedavi

2.7.1. TDM'lerin Tedavisinde Kullanılan Öncelikli İlaçlar

TDM enfeksiyonlarının tanısı kadar tedavisi de güçtür. Tedavi rejimleri pahalıdır ve yan etkiler sebebiyle zor tolere edilmektedir. Birçok hastanın uzamış tedaviye ihtiyaç duyması ve eradikasyon güçlüğü sebebiyle tedavi kararı dikkatle verilmelidir. Karar verirken hastalığın ilerleme riski ile tedavinin maliyeti ve toksisitesi arasındaki denge göz önünde bulundurulmalıdır. Hastalarda ulaşılması zor olması sebebiyle kür hedeflenmesi yerine progresyonun minimize edilmesi ve semptomatik tedavi amaçlanmalıdır^{60,61}.

Tüberküloz dışı mikobakterilere bağlı akciğer hastalığının tedavisi makrolid öncesi ve sonrası dönem diye ikiye ayrılabilir. Makrolidler, 50S Ribozomal subünite bağlanır ve protein sentezini inhibe ederek etki gösterir. Eritromisin methylaze genleri (ERM) makrolidlerin bu bağlanmasını engeller ve inhibitör aktivitesini azaltır^{60,61}. Hızlı büyüyen mikobakteriler başta olmak üzere bazı mikobakterilere karşı gelişen makrolid direncinin temel mekanizması ERM genlerinin varlığıdır. *M. abscessus* ve *M. fortuitum* türlerinin bütün izolatları ve diğer hızlı büyüyen mikobakteriler (*M. chelonae* hariç) ERM genleri içermektedir. *M. tuberculosis* de aynı zamanda bu gene sahiptir ve bu onun makrolidlere karşı olan direncini açıklamaktadır. Bu genlerin en ilginç ve en üzücü özelliği *M. fortuitum* ve *M. abscessus* izolatları makrolid ile karşılaşınca hemen ERM genleri aktive olur. İn vitro minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinden bağımsız olarak in vivo direnç kazanır. Yani organizma in vitro ortamda makrolide duyarlı görünürken in vivo olarak dirençli olacaktır. Tedavi başarısı klinik ve radyolojik iyileşme ve balgam konversiyonun sağlanması ile elde edilir. Tedavi süresince her ay balgam kontrolü yapılmalıdır. Genellikle 4-6 ayda klinik iyileşme, 6-12 ayda balgam kültüründe negatifleşme sağlanır. Tedavi kültür negatifliği sağlandıktan sonra 12 ay devam etmelidir. Bu sebeple tedavi süresi 18-24 aydır. Altı ayda klinik iyileşme, 12 ayda kültür negatifleşmesi sağlanamayan olgular tedavi başarısızlığı olarak kabul edilir. Tedavi başarısızlığının sebebi; tedaviye uyumsuzluk, intolerans, ilaç direnci ve anatomik defektler (kavitasyon, bronşektazi)'dir. Bazı hastalarda cerrahi tedavinin tedavi başarısını arttırdığı gösterilmiştir. Cerrahi tedavinin belirli kriterleri olmamakla birlikte adjuvan veya alternatif tedavi olarak akılda tutulmalıdır. Özellikle medikal tedavinin başarısız yada yetersiz olduğu olgular ve tekrarlayan hemoptizili olgularda denenmelidir. Lokalize hastalıkta küratif olabilir. Ayrıca dirençli olgularda medikal tedavi ile kombine edildiğinde başarı oranının arttığı gösterilmiştir^{60,61}.

Geniş çapta yapılan araştırmalara göre Rifampin ve INH gibi sık kullanılan antitüberküler ilaçlar *M. fortuitum* ve *chelonae* kompleksine bağlı enfeksiyonların tedavisinde herhangi bir rolü olmadığını belirlemektedir ayrıca, Clarithromycin⁶² ve amikacin-doxycycline kombinasyonunun *M. fortuitum-chelonae* enfeksiyonlarına karşı etkili olduğu gözlenmiştir. *M. marinum* ve *M. szulgai* bağlı enfeksiyonların tedavisinde trimethoprim-sulfamethoxazole ve doxycyclin kombinasyonu önerilmiştir^{63,64}.

TDM infeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen başlıca ilaçlardan bazıları hakkında aşağıda ayrıca bilgi verilmiştir.

2.7.1.1. Klaritromisin (CLA)

On dört üyeli halka yapısına sahip bir makroliddir. Eritromisinin lakton halkasının C6 hidroksi grubu bir metoksi grubu içerecek şekilde değiştirilmiştir. Bu değişiklik ile mide asidine dayanıklılık ve oral biyoyararlanım artırılmış, gastrointestinal intolerans azaltılmıştır. Klaritromisinin film kaplı tabletleri, yavaş salımlı tablet, intravenöz uygulama için flakon ve granül şeklinde oral süspansiyonları bulunmaktadır^{65,66}. Klaritromisinin hızlı salımlı tabletlerinin tepe plazma konsantrasyonu, yemeklerle birlikte alındığında % 24 artmaktadır, ancak toplam biyoyararlanım değişmemektedir. Geç salımlı formülasyonun biyoyararlanımı ise, aç karnına alındığında % 30 azalmaktadır. Bu sebeple yemeklerle birlikte alınmalıdır^{66,67}. Makrolidler ve ketolidler lipofilik bileşikler olup, vücut sıvı ve dokularına yaygın olarak dağılırlar. Klaritromisinin doku konsantrasyonu serum konsantrasyonundan 2-20 kat daha fazladır⁶⁶. Klaritromisin karaciğerde sitokrom p450 3A4 (CYP3A4) enzimleri tarafından aktif olan 14-hidroksi metabolitine dönüşmektedir. Oral dozun % 30-40'ı değişmeden veya metabolit halinde idrarla atılmaktadır^{66,68}.

2.7.1.2. Moxifloxacin (MOX)

Florokinolonlar, DNA giraz (topoizomeraz II) enzimini inhibe etmek suretiyle DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozarak bakteri hücrelerini öldürürler⁶⁹. Etki mekanizması; DNA giraz DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve onarımında görev alır. Topoizomeraz IV ise replikasyon sırasında oluşan yavru DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılarak yavru hücrelere geçmelerine yardım eder. DNA giraz (topoizomeraz II) enzimi *gyrA* geni tarafından kodlanan iki A alt birimi ile *gyrB* geni tarafından kodlanan iki B alt biriminden oluşmaktadır. Topoizomeraz IV ise *parC* geni tarafından kodlanan iki parC alt birimi, *parE* geni tarafından kodlanan iki parE alt biriminden oluşmaktadır. Tip 2 topoizomerazlardan olan bu iki enzim kinolon grubu antibiyotiklerin hedefini oluşturmaktadır. Topoizomeraz-DNA kompleksine bağlanan kinolonlar DNA sentezini

hızla inhibe ederler. Kinolonların bakterisidal etkilerinin ortaya çıkmasında DNA sentezinin inhibisyonu temel olmakla birlikte farklı mekanizmaların da hücre ölümünde rol oynadığı sanılmaktadır. Ayrıca çok yüksek antibiyotik konsantrasyonlarında RNA ve protein sentezinin inhibisyonu ile bakteriyostatik etki gösterdikleri belirlenmiştir. Kinolon grubu antibiyotiklerin Gram negatif bakterilerde öncelikli hedefinin DNA giraz, Gram pozitiflerde ise topoizomerez IV olduğu bilinmektedir^{70,71,72}.

Moksifloksasin yeni geliştirilmiş bir 8-metoksifloro-kinolondur. Son yıllarda birçok yeni gelişme Moxifloxacin'in, M. Marinum'a karşı daha etkili olduğunu göstermiştir⁷³. Son raporlara göre M. smegmatis'lerde mycotil mutantların yokluğunu antibiyotikle daha iyi inhibe olması bildirilmiştir⁷⁴. Ayrıca C8 halogen ve Metoxy moieties kısımları fluorokinolon'lara karşı etkinliğinin artırması dirençli gyrase mutantlarında gösterilmiştir⁷⁵.

2.7.1.3. Doxycycline (DOX)

Dox; tetrasiklin grubu bir antibiyotik olup nispeten geniş spektrumlu bir antibiyotik olması sebebiyle hem tıbbiye de hem de veterinerlikte oldukça geniş çapta kullanılmaktadır. Dox 1967 yılında keşfedilmiş ve antimikrobiyal özelliklerine ek olarak organizmanın fizyolojisi üzerine de etkisi olduğu geniş ölçüde araştırmalar neticesinde anlaşılmıştır. Dox'u diğer tetrasiklinlerden ayırt eden birçok nitelik vardır. Bunlardan biri ağız yoluyla kolay emilebilir olmasıdır.

2.7.1.4. Amikacin (AMK)

Bir aminoglikozit olan amikasin birçok mikobakteri türüne karşı oldukça aktiftir. TDM infeksiyonlarının tedavisinde de önemli bir ilaç olabilir. AMK; 30s ribosomal subünitte 16S rRNA'nın korunmuş olan A bölgesine sıkı bir şekilde bağlanarak protein sentezini inhibe ediyor. Aminoglikozit grubu antibiyotikler *M. tuberculosis* de dahil olmak üzere birçok TDM türü üzerine oldukça etkili bir ilaçtır. Aminoglikozitler ile beta lactam grubu antibiyotiklerin kombine tedavileri de mevcuttur⁷⁷.

2.7.1.5. Trimethoprim-Sulfamethoxazole (TMP-SMX)

TMP-SMX; farklı TDM türlerinin tedavilerine farklı MİK değerlerine göre verilebilir. Örneğin; yavaş üreyen mikobakterilerden *M. kansasii*'nin hassas olduğu konsantrasyon değeri $\leq 1/19$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, *Nocardia* ve hızlı üreyen mikobakteri türleri için ise, MİK değeri $\leq 2/38$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ şeklinde belirlenmiştir. *M. marinum* üzerine de oldukça etkili bir antibiyotiktir⁷⁸.

2.8. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerde Tanı

Tüberküloz dışı mikobakteri suşları doğada ve çevremizde çok yaygın olduğundan herhangi bir TDM suşunun belirlenmesi nonsteril su kaynakları başta olmak üzere çevresel kontaminasyonun bir sonucu olabilir. Bu sebeple hangi TDM suşunun klinik açıdan önemli olduğu konusunda tanı kriterlerinin belirlenmesi gerekir. Genel olarak tanı kararı, elde edilen izolatın virülansına, hangi respiratuvar örnekten alındığına bağlı olarak verilmelidir¹³.

M. kansasii ve *M. szulgai* gibi bazı TDM türleri solunum yolu örneklerinden izole edildiğinde hemen hemen her zaman hastalıkla ilişkili bulunmuştur¹³. Bazı vakalarda bu türlerden birinin (özellikle *M. kansasii*) tek bir kültür pozitifliği ile tanıya gidilebilir. Bunun aksine *M. simiae* ve *M. fortuitum* gibi bazı TDM suşları da vardır ki TDM akciğer hastalığı tanı kriterlerini karşılasalar bile solunum yolu patojenleri olarak kabul edilmezler^{79,80}. Bunun yanı sıra *M. gordonae* ve *M. terrae* kompleks gibi türlerin izolasyonu genellikle solunum yolu kontaminasyonu olarak öngörülür⁵⁴. Dolayısıyla klinisyenin TDM akciğer hastalığı tanısını koyarken birçok faktörü ele alması gerekmektedir.

Klinisyenlerin sıkça karşılaştıkları bir problem, tüberküloz tedavisi altındaki hastadan bir TDM suşunun izole edilmesidir. Jun ve ark. 958 tüberkülozlu hastanın 68'inde (%7,1) bir TDM suşu izole edildiğini rapor etmişlerdir⁸¹. Yazarlar tüberküloz hastalarında TDM suşu izole edilmesinin nadir bir olay olmadığını belirtmiştir. Ancak bu hastaların tüberküloz tedavisinin tamamlanmasından sonra, özellikle virülan suşlar için, takip edilmesi gerekliliği konusunda görüş birliğine varmışlardır.

2.8.1. TDM İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Kullanılan Biyokimyasal Testler

TDM enfeksiyonlarında, özgül klinik bulgular yoktur. Kesin tanının mikrobiyolojik inceleme sonucunda konması gereklidir. TDM türlerinin tanımlanması amacıyla kullanılan çeşitli klasik biyokimyasal yöntemler mevcuttur. Bu biyokimyasal yöntemlerde genel olarak, kültür yöntemleriyle bakteri üretildikten sonra, TDM türlerinin fenotipik özellikleri araştırılmaktadır. Ancak fenotipik özellikler sadece sınırlı sayıda türün birbirinden ayırtedilebilmesini sağlayabilmektedir¹.

Bunlardan katalaz testi, *M. tuberculosis*, *M. gastri* ve *M.kansasii*'yi diğer mikobakterilerden ayırtedebilmek amacıyla kullanılır. Tüm mikobakteriler katalaz deneyi ile olumlu sonuç verirken, bu üç mikobakteri türü olumsuz sonuç verirler¹.

MacConkey agarda üreme testi, *M. fortuitum* ile *M. chelonae*'nin diğer mikobakterilerden ayrılmasını sağlar. Sadece bu iki mikobakteri türü MacConkey agarda üreme gösterirler. Niasin testi, *M. tuberculosis*'in tanımlanmasını sağlar. *M. tuberculosis*'in üreme esnasında besiyeri ortamına saldığı niasin, siyanojen bromür veya anilin eriyiği gibi ayıraçlarla belirlenerek *M. tuberculosis* varlığı doğrulanır. Diğer mikobakteriler niasin salgılamazlar¹.

Pirazinamidaz testi, bazı mikobakterilerin pirazinamidi pirazinoik aside parçalaması esasına dayanır. Bu test ile *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare* ve *M. marinum* pozitif sonuç verirken, *M. bovis* ile *M. kansasii* negatif sonuç verirler¹.

Thiophene-2 karboksilik asit hidrazid testi, *M. tuberculosis* ile *M. bovis*'i birbirinden ayırmak amacıyla kullanılır. *M. tuberculosis*, içinde thiophene-2 karboksilik asit hidrazid bulunan Middlebrook besiyerinde ürerken, *M. bovis* bu besiyerinde üremez. Görüldüğü gibi biyokimyasal testler, ancak belli mikobakteri türlerinin birbirlerinden ayırtedilmesini sağlayabilmektedir. Ayrıca kesin tanımlama yapılabilmesi için bu testlerin hepsinin uygulanması gerektiğinden ve bunun için uzun bir süre gerektiğinden, günümüzde biyokimyasal testler rutin kullanımda çok fazla kabul görmemektedirler¹.

2.8.2. Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerin Radyolojik Özellikleri

Kaviter TDM akciğer hastalığı radyografide kolayca izlenebilir. Bu kaviteler tüberkülozdan farklı olarak ince duvarlı olup parankimal lezyonlardan çok plevral reaksiyonlarla daha sıkı ilişkilidir. Hastalığın diğer formları yüksek çözünürlüklü akciğer tomografisi (YÇBT) ile daha iyi değerlendirilir. En sık YÇBT bulguları bilateral sentrilobüler nodül ve silindirik bronşektazidir⁸². Bu değişiklikler esas olarak MA ve *Myc. abscessus* gibi organizmaların bronşiyoler ve peribronşiyoler dokuya invazyonu ve enflamasyonunun bir sonucudur⁸³. Kavitasyon ve konsolidasyon gibi daha ağır bulgular ve kadın cinsiyet ek risk faktörlerini oluşturur. Klasik olarak multifokal bronşektazi ve diffüz sentrilobüler nodülleri olan, orta lob ve linguler lob tutulumları gözlenen yaşlı ve sigara içme öyküsü olmayan kadın cinsiyetin olduğu klinik tabloya Lady Windermere sendromu adı verilmiştir⁸⁴. MAC'ye bağlı akciğer hastalığında yapılan seri BT çalışmalarında bronşektazinin tüm nodüler alan boyunca progresif olma eğiliminde olduğu ve sonuçta konsolidasyon olarak ortaya çıkabileceğini göstermiştir.

MAC ile ilişkili gelişen hipersensitivite pnömonisinde YÇBT bulguları sıklıkla diffüz buzlu cam infiltrasyonları ve sentrilobüler nodüllerdir⁸⁵.

Nadir olmakla beraber birkaç TDM bağlı akciğer hastalığında soliter pulmoner nodül veya kitlelerde tanımlanmıştır⁸⁶.

2.9. TDM İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Fenotipik Yöntemler

2.9.1. Mikroskopi

Aside dirençli organizmalar olan mikobakteriler için başıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir. Basiller Karbolfuksin yönteminde (Ziehl-Neelsen, Kinyoun) kırmızı renkte, Florokrom yönteminde (auramin O, auramain-rhodamin) ise sarı-oranj renkte floresan verir şekilde görülür. Aside dirençli boyama, mikobakterilerin lipidden zengin hücre duvarlarının primer boya ile boyanması ve renk giderici ajan asid alkolle muameleden sonra boyalı kalması esasına dayanmaktadır. Bu sebeple mikroorganizma aside dirençli basil olarak adlandırılmaktadır. Yayma duyarlılığı % 22-80 arasında değişmektedir. Direk mikroskopi ile görülebilmesi için, balgamın her ml' de 5000-10000 basil bulunması gereklidir.

Değerlendirme yapılırken 300 mikroskop sahası tarandıktan sonra hiç basil görülmezse negatif denmelidir. Alanlar taranırken 1-2 basil şüpheli, 100 alanda 1-9 basil görülmesi (+), 10 alanda 1-9 basil görülmesi (++), her alanda 1-9 basil görülmesi (+++), her alanda 10 ve üzeri basil görülmesi (++++) olarak yorumlanmaktadır²¹.

2.9.2. Kültür Ortamında İzolasyon Yöntemleri

Kültür yöntemleri TDM tanısında altın standart olarak devam etmektedir. Mikobakteriyel kültür yöntemleri katı besiyerleri ve sıvı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Katı besiyerleri agar ve yumurta bazlı iki çeşiti bulunmaktadır. Petragani ve American Trudeau Society gibi katı besiyerleri dışında günümüzde en yaygın kullanılan katı besiyeri, Lowenstein-Jensen (LJ)'dir. İçeriğinde patates unu, gliserol, tuz, yumurta bulunmasıyla kontaminasyonu engellerken aynı zamanda tüberküloz bakterisi için uygun üreme şartlarını sağlar. En çok tercih edilen agar bazlı besiyerleri ise Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11'dir. Sıvı besiyerlerinin, MB Redox, BACTEC 460TB, BACTEC MGIT 960, BACTEC 900 MB, ESPII, MB/BacT ALERT 3D gibi çeşitleri bulunmaktadır. MB Redox genellikle düşük kapasiteli laboratuarlarda tercih edilen manuel bir sistemdir. Mikobakterilerin izolasyonu amacıyla modifiye Kirchner besiyeri kullanılır. İçerisinde tetrazolium tuzu bulunması mikobakterilerin redoks sistemi sayesinde yüzeylerinde biriken pembekırmızı renklerinde formazona indirgenir. Üreme sonucu oluşan renkli mikrokoloniler makroskopik olarak görülür²¹.

2.9.2.1. İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Kart ve İnhibisyon Testleri

Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan geleneksel yöntemler; direkt mikroskopik olarak ARB inceleme, katı veya sıvı besiyerinde üreme ve biyokimyasal testleri içermektedir. Klasik tanı yöntemleri halen önemini korumakla birlikte, etkenin üretilmesi, tanımlanması ve ilaç duyarlılığının belirlenmesinin geç ve güç olması sebebiyle daha duyarlı ve hızlı yöntemlere gereksinim vardır. Bu amaçla geliştirilen immünokromatografik yöntemler de hızlı tanı seçenekleri arasında yer almaktadır.

İmmünokromatografik bir yöntem olan SD Bioline Ag MPT64 Rapid ticari kiti (Standard Diagnostics, Kore) MTBK suşlarına özgül MPT64 proteininin, monoklonal

MPT64 antikorları kullanılarak belirlenmesi esasına dayanır. MPT64, *M. tuberculosis*, *M. africanum* ve *M. bovis*'i de içine alan MTBK üyelerine ait 23 kDa ağırlığında bir membran proteini olup, kültür filtratları ve biyopsi materyallerinde yüksek düzeyde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, TB Ag MPT64 testinin, MTBK ve tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM)'in ayırımında kullanılabilirlik başarılı ve hızlı bir yöntem olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu yöntem, kültürde üretilen MTBK suşlarının erken tanımlanmasına ve tedavinin gecikmemesine olanak sağlamaktadır^{87,88,89}.

Kültür ortamında izole edilen kolonilerde MTBK ile TDM identifikasyonu için bir diğer önemli yöntem inhibisyon testidir. Bu testin sonuçlarının İmmünokromatografik TB Ag MPT64 kart testi sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi sonuçların güvenilirliğini artırır. İnhibisyon testi olarak BACTEC 460TB Sisteminde p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) testi kullanılırken, BACTEC MGIT 960 Otomatize Sisteminde NAP testi yerine p-NBA (Para Nitro Benzoik Asit Reaktif) testi tercih edilmektedir⁹⁰.

2.10. TDM İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler

Günümüzde klinik örneklerde belirlenen mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla biyokimyasal testler yerine moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Mikobakterilerin moleküler yöntemlerle identifikasyonunda, hedef olarak seçilmiş olan en önemli gen bölgeleri, 16S rRNA, *hsp65*, *recA* ve *rpoB* genleridir. 16S rRNA geni, bakterilerin moleküler identifikasyonunda altın standart olarak kabul edilen bir hedef bölgedir. Çünkü hem her bakteriye özgü çok iyi saklanmış diziler içerir, hem de her türe göre değişen dizilere sahiptir. Bu değişken dizilerin PCR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir. 16S rRNA geninin dizi analizi tüm mikobakteri türlerinin tanımlanmasını sağlayabilmektedir. Ancak dizi analizi yöntemlerinde, elde edilen bakteri dizilerinin bilgisayar ortamında karşılaştırılması gereken standart dizilere ihtiyaç vardır. Değişik kaynaklardan elde edilmiş standart dizilerde de zaman zaman farklılıklar ortaya çıkabilmekte ve yanlış sonuçlara sebep olabilmektedir. Bir standardizasyon sağlamak ve dizi analizi sonuçlarının güvenilirliğini arttırmak amacıyla kurulmuş standart dizi analizi servisleri mevcuttur. Bu servislerden biri olan RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), web tabanı üzerinde dizi analizi yanısıra fenotipik ve genotipik

özellikleri de sunmaktadır. Ayrıca dizi analizi amacıyla üretilmiş olan ticari kitler de mevcuttur. Bunlardan MicroSeq 500 16S rDNA bakteriyel dizi analizi kiti (Applied Biosystems), mikobakteriyel 16S rRNA 5' ucundan 500 baz çiftlik bir bölgenin amplifikasyonunu ve sonrasında dizi analizini sağlayarak tür düzeyinde identifikasyon gerçekleştirmektedir. 16S rRNA dizilerinin karşılaştırılması mikobakterilerin identifikasyonunda güvenilir bir yöntem olmakla birlikte, *M. gastri* ve *M. kansasii* gibi bazı türlerin ayırtedilmesinde yetersiz kalabilmektedir. Bu gibi türlerin identifikasyonu amacıyla, *recA* gen dizilerinin karşılaştırılmasından da yararlanılmaktadır. *recA* geni tüm bakterilerde bulunan, DNA hasar onarımı, DNA sentezi ve hücre bölünmesinde rolü olan bir genidir. Bu gen bölgesinin kullanılmasıyla, özellikle 16S rRNA gen dizileri çok benzer çıkan türlerin ayırtedilebildiği gösterilmiştir. "Single-stranded conformation polymorphism analysis" (SSCP) yöntemi, mikobakterilerin identifikasyonunda dizi analizine alternatif olan bir yöntemdir. Bu yöntemde hedef genin PCR ile çoğaltılmış küçük dizileri kullanılır. Bu diziler ısı ile denatüre edilerek, tek zincirler elde edilir. Tek zincirlerin renatürasyonu sonrasında, farklı dizilerdeki parçalar farklı tersiyer konformasyonlar oluştururlar. Bu parçalar elektroforez ile ayrıştırıldığında, her parça farklı bir hızla hareket eder. Bu yöntem temel olarak genomik DNA'daki nokta mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılır. Bunun yanısıra son yıllarda, 16S rRNA geninin PCR ile çoğaltılmış parçalarının SSCP analizi, bakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılmaktadır. Mikobakteri türlerinin identifikasyonuna yönelik olarak geliştirilmiş olan SSCP yönteminde, mikobakteriyel 16S rRNA geninin değişken bölgelerine özgül dört ayrı çift iplikçikli parça, dört çift fluoresan primer ile çoğaltılmakta ve elde edilen ürünlerin SSCP analizi yapılmaktadır. Bu yöntemle PCR sonrasında SSCP analizi sonucu 30 dakika içinde alınabilmekte, kapiller elektroforez sistemi sayesinde aynı anda 16 örnek test edilebilmektedir. Hızlı ve spesifik bir yöntemdir. PCR-restriksiyon enzim analizi yöntemi, mikobakterilerin identifikasyonunda kullanılan pratik ve ekonomik bir yöntemdir. Restriksiyon enzim analizi için çeşitli çalışmalarda 16S rRNA, *hsp65* "heat shock protein" geni ve *rpoB* geni hedef olarak seçilmiştir. Yapılan çalışmalarda, RNA polimeraz enzimini kodlayan *rpoB* geninin dört restriksiyon enzimi ile (*HaeIII*, *HindII*, *MvaI* ve *AccII*) kesilmesi ile elde edilen bant paternleri, standart bant paternleri ile karşılaştırılarak mikobakteri türlerinin identifikasyonu sağlanmıştır. PCR-

restriksiyon enzim analizi yönteminde son yıllarda seçilmiş hedef bölgelerden biri de ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesidir. Bu bölge, 16S ve 23S rRNA'ları kodlayan genler arasında bulunan bir diziden oluşmaktadır. Bu dizide de, her türe özgü farklı nükleotidler bulunması sebebiyle, yapılan çalışmalarda mikobakterilerin idantifikasyonu sağlanabilmiştir. Ancak bu bölgedeki polimorfizm oranının çok yüksek olması sebebiyle, sonuçların değerlendirilmesinde bazı zorluklar yaşandığı görülmüştür. 65 kDa ağırlığındaki hsp65 genini hedef alarak yapılan PCR-restriksiyon enzim analizi, yaygın olarak kullanılmakta olan mikobakteri idantifikasyon yöntemlerinden biridir. hsp65 geni, hem çok iyi korunmuş diziler içermekte, hem de türden türe farklılık gösteren diziler bulundurmaktadır. Bu genin 441 baz çiftlik bir dizisi PCR-restriksiyon enzim analizinde çoğaltılarak kullanılmaktadır. İki özgül primer kullanılarak çoğaltılan ürünler, *BstII* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmektedir¹.

Böylece elde edilen restriksiyon parçaları poliakrilamid jelde yürütülerek ayrıştırılmaktadır. Poliakrilamid jel elektroforezi sonrasında görülen bantın molekül ağırlığının tam olarak anlaşılabilmesi için molekül ağırlık standartı ile karşılaştırılması gereklidir. İki restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda, 80'e yakın mikobakteri türünün herbiri kendine özgü bantlar oluşturduğundan, oluşan bantların molekül ağırlığının belirlenmesi mikobakterilerin idantifikasyonunu sağlamaktadır. Bunun için tek yapılması gereken, örneklerde oluşmuş bantların moleküler ağırlık standartı ile karşılaştırılarak ağırlıklarının belirlenmesi ve hangi türün bantları ile uyduğuna bakılmasıdır. Böylece her örnekte iki restriksiyon enzimi ile oluşturulan parçalardaki bantlar göz önünde bulundurulurken TDM türünün ismi belirlenebilmektedir. Ancak bazen klasik moleküler ağırlık standartları ile yapılan karşılaştırmalarda, birbirine çok yakın bantların değerlendirilmesinde güçlükler yaşanabilmektedir. Bu güçlüğü aşabilmek amacıyla geliştirilmiş olan bir TDM idantifikasyon kitinde, bilinen mikobakteri türlerinin hem *Bst II* restriksiyon enzimi ile, hem de *Hae III* restriksiyon enzimi ile kesildiğinde oluşturacağı olası bant şekillerini içeren iki değişik moleküler ağırlık standartı bulunmaktadır (Diomed). Bu iki moleküler ağırlık standartı ile karşılaştırma yapılırken, elde edilmiş olan bantların tamamının bir karşılığı olduğundan, değerlendirme sırasında hata payı önemli ölçüde azalmaktadır^{1,54}.

Son yıllarda TDM infeksiyonlarının tanısında mikolik asit analizi de kullanılmaya başlanmıştır. Mikolik asitler mikobakteri hücre duvarının önemli bir kısmını oluşturan uzun zincirli β -hidroksi yağ asitleridir. Her mikobakteri türünde farklı fonksiyonel gruplar ve farklı karbon sayılı mikolik asitler bulunur. Mikolik asitlerdeki karbon atomu sayısı genellikle 60 ile 90 arasında değişir. Bu türe özgü farklılıklar sebebiyle mikolik asit analizi gerçekleştirilerek mikobakterilerin idantifikasyonu yapılabilmektedir. Bu amaçla kullanılan yöntemler “thin-layer chromatography” (TLC), high-performance liquid chromatography” (HPLC) ve “gas-liquid chromatography” (GLC) yöntemleridir. TLC yöntemi uygulanarak, mikolik asitler taşıdıkları ester gruplarına göre 7 grup altında toplanmaktadırlar. Bundan sonraki aşamada, mikobakteri hücresinden metil esterifikasyonu ile saflaştırılan mikolik asitler silikon jel üzerinde yürütülmekte ve oluşan paternler standart suşlarla karşılaştırılarak idantifikasyon sağlanabilmektedir⁵⁴.

HPLC analizinde, mikolik asitler polarite ve karbon sayılarına göre ayırtedilebilmektedir. Daha polar olan ve kısa karbon zincirli mikolik asitler, daha kısa elüsyon zamanlarına sahip olmaktadır. Bu aşamadan sonra elde edilen grafikler (kromatogram), standart suşların grafikleriyle karşılaştırılarak idantifikasyon sağlanmaktadır. GLC yönteminde ise sadece mikolik asitler değil, mikobakteri hücre duvarının bütün yağ içeriği analiz edilerek idantifikasyon yapılmaktadır. Bu üç mikolik asit analiz yöntemi içinde en güvenilir sonuçlar elde edilen yöntem HPLC yöntemidir. TLC ve GLC yöntemleriyle bazı mikobakteri türleri aynı paternleri verdiği için, her türün idantifikasyonu mümkün olmamaktadır. Sonuç olarak, TDM infeksiyonlarının laboratuvar tanısında biyokimyasal testler, pratik olmamaları, uzun zaman gerektirmeleri ve tüm türlerin tanımlanmasını sağlayamadıklarından, rutin kullanım için uygun değildirler. Moleküler yöntemler, mikobakteri türleri arasında farklılık gösteren gen bölgelerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Hedef olarak seçilen basilica gen bölgeleri 16S rRNA, *hsp65*, *recA* ve *rpoB* genleridir. Bu gen bölgelerinin dizi analizi sonucuna göre belirlenerek, standart suşlarla karşılaştırılması ile güvenilir bir şekilde tür tayini yapılabilmektedir. Ancak dizi analizi sadece büyük referans laboratuvarlarında yapılabilen pahalı bir yöntemdir. SSCP ve HPLC yöntemleri, dizi analizine alternatif olarak kullanılabilecek hızlı ve özgül yöntemlerdir. PCR-restriksiyon enzim analizi yöntemi de,

yaygın olarak kullanılmaya başlanmış olan bir diğ er alternatif y ontemdir. Restriksiyon enzim analizi için çeşitli çalışmalarda 16S rRNA, *hsp65* geni ve *rpoB* geni hedef olarak seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar, PCRrestriksiyon enzim analizi y onteminin rutin laboratuvar kullanımına uygun, ekonomik, pratik ve hızlı bir y ontem olduğunu g stermektedir^{1,54}.

Tüberküloz dışı mikobakteri türlerinde son 10 yıl içinde görülen bu artış, doğada bu türdeki organizmaların hızla yaygınlaşmasından kaynaklanmamaktadır. Bunun en temel sebebi, TDM türlerinin ayırımını sağlayan moleküler tekniklerdeki geliřmelerdir⁵⁴.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Dünyada her geçen gün önemi artmakta olan tüberküloz dışındaki diğer patojen mikobakteri (TDM) türlerinin bölgemizdeki sıklığının ve direnç paterninin belirlenmesini, epidemik potansiyele sahip mikobakteriyel türlere karşı önlem çalışmalarının başlatılabilmesini ve bunun için TDM infeksiyonlarında en çok tercih edilen antibiyotiklerden Moxifloxacin, Amikacin, Clarithromycin, Trimethoprim-Sulfamethoxazole ve Doxycycline'e karşı izolatların duyarlılıklarının Löwenstein Jensen - Agar Proporsiyon Duyarlılık (LJ-APD) testi ile belirlenmesini hedef alan bu çalışmaya; 2012 Kasım - 2014 Eylül tarihlerinde ÇÜ THAUM ve Bölge Tüberküloz Laboratuvarına tüberküloz şüphesiyle gönderilen 21918 klinik örnek değerlendirmeye alınmıştır.

3.1.1. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemi

Mikobakteri türlerinin geç ve güç üredikleri göz önüne alındığında hızlı üreyen diğer bakterilerin elemine edilmesinin aciliyeti dekontaminasyon–homojenizasyon konsantrasyon işleminde bir adım daha öne çıkmaktadır. Bu sebeple çalışmamız süresince gelen örneklerin tamamı dekontaminasyon–homojenizasyon ve konsantrasyon işlemine tabi tutularak işlenmiştir.

3.1.1.1. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemine Hazırlık

N-asetil-L-sistein-%4 NaOH- (NALC-NaOH) için gerekli malzemeler;

NaOH	40 gr
Trisodyum sitrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7-2\text{H}_2\text{O}$)	14,5 gr
Distile su	1 lt

İçerikler homojen hale gelene kadar karıştırıldı Karışım 120°C'de 30 dakika otoklavlandı. Şişelere bölünüp buzdolabında saklandı.

Fosfat tamponu (PBS) için gerekli malzemeler;

Disodyum fosfat (Na ₂ HPO ₄)	23,11 gr
Monopotasyum fosfat (KH ₂ PO ₄)	18,16 gr
Distile su	4 lt

İçerikler homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Karışımın PH'sı 6,8'e ayarlanıp 120°C'de 30 dakika otoklavlandı. Şişelere bölünüp buzdolabında saklandı.

3.1.1.2. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemi Uygulanışı

Örneklerin tamamına N-asetil-L-sistein-%4 NaOH- (NALC-NaOH) yöntemi kullanılarak dekontaminasyon–homojenizasyon ve konsantrasyon işlemleri uygulandı. Bu işlemler için sırasıyla şu yöntemler baz alındı:

1- Falkon tüpünde gelmiş olan örneğe kendi miktarı kadar NALC-NaOH karışımı eklenip 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslendi. Daha sonra oda ısısında 15 dakika bekletildi bu sürenin aşılmamasına azami özen gösterildi. Bu işlemle diğer bakterilerin elemine edilmesi ve şayet varsa mikobakterilerin balgamın yoğun yapısı içerisinde açığa çıkması sağlandı. (dekontaminasyon işlemi) Dekontaminasyon işlemi takiben yapılacak her işlemde asepsi-antisepsi kurallarına uyulmaya özen gösterildi.

2- Sonra falkon tüpünün 45-50 ml çizgisine kadar 0,067 M fosfat tamponu (PBS) (pH 6.8) ilave edilip, karışım el yardımıyla alt üst edildi. Bu çözelti asit-baz dengesini sağladı. (homojenizasyon işlemi)

3- Daha sonra bu karışım 3000 g'de 15 dakika santrifüj (Eppendorf Soğutmalı Microsantrifüj cihazında, GERMANY) edildi (konsantrasyon işlemi).

4- Santrifüj akabinde süpernatant kısım dökülüp dipte kalan pellet üzerine kendi miktarı kadar tekrar PBS tampon çözeltisi eklendi ve pipetaj işleminden sonra 0,8 ml Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik, Trimethoprim, Azlosilin asit-(PANTA) Supplement eklenmiş MGIT tüpüne 0,5 ml, Lowenstein-Jensen (LJ) ağara (Becton Dickinson, ABD) ise 0,3 ml oranında rutin olarak işlenen kültür ekimleri yapıldı.

3.2. Fenotipik İncelemeler

Çalışma sırasında (2012 Kasım–2014 Eylül) gelen örnekler rutin uygulamalarda yapıldığı üzere doğrudan ve teksif sonrası mikroskopik olarak inceledikten sonra mikobakterilerin identifikasyonunda altın standart olarak kabul edilen kültür ortamında izolasyon için LJ besiyeri ve MGIT 960 otomatize sistemi kullanıldı. Kültürde izole edildikten sonra, MTBK ve TDM ayrımı için İmmünokromatografik TB Ag MPT64 kart testi yapıldı. MPT64(-) bulunan örnekler için TDM doğrulanması açısından p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen / para nitro benzoik asit (NAP/p-NBA) testi kullanıldı. TDM bulunan örneklerle antibiyotik duyarlılık tespiti için LJ-APD yöntemi uygulandı.

3.2.1. Örneklerin Mikroskopik İncelenmesi

Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar karbol fuksin yöntemi (Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN)) ile boyandıktan sonra mikroskopik olarak mikobakteriler incelendi. Bu inceleme gelen örneklere hiçbir işlem yapılmaksızın doğrudan (direkt ARB boyama) ve dekontaminasyon–homojenizasyon ve konsantrasyon işleminden sonra (teksif sonrası ARB boyama) olmak üzere iki aşamada yapıldı.

Ayrıca, kültür ortamında üretilen kolonilerin morfolojik incelemesi için de bu boyama yöntemi kullanıldı.

3.2.1.1. Karbol fuksin yöntemi (Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN))

Mikobakteriler hücre duvar yapılarında bulunan %70 yağ asitleri oranıyla boyanmaları diğer bakterilere nazaran daha güçtür. Bu sebeple EZN adı verilen en eski boyama yöntemiyle asit-alkol karışımına dirençli şekilde boyanırlar. Asit-alkole dirençli mikroorganizmalar ışık mikroskopunda mavi zemin üzerinde pembe-kırmızı renkte basiller şeklinde görülürler.

Çalışmamız süresince gelen örneklerden yayma preparatlar hazırlanarak EZN yöntemiyle boyamaları yapıldı ve mikroskopta mavi zemin üzerinde pembe-kırmızı basillerin görülmesi sonucu ARB-pozitif olarak değerlendirildi.

EZN boyama yöntemi olarak;

1- Karbol Fuksin

2- Asit-Alkol

3- Metilen Mavisi kullanılır.

3.2.1.1.1. EZN Boyasının Hazırlanışı

Karbol Fuksin boyası içerikleri

Bazik fuksin (karbol fuksin)	1 gr
Fenol kristalize	5 gr
Saf etil alkol	10 ml
Saf su	100 ml

%3'lük Asit-Alkol içerikleri

Hidroklorik Asit (HCL)	3 ml
%95'lik Etil alkol	97 ml

Metilen Mavisi içerikleri

Metilen mavisi	2 gr
Borax (sodyum tetra borat kristalize)	5 gr
Saf su	100 ml

3.2.1.1.2. EZN Boyama İşlemi (ARB/AARB Boyama)

Yayma sonrası havada kurumaya bırakılan preparatlara ateşle fiksasyon işleminden sonra karbol fuksin damlatıldı ve 3-4 dakika bekletildi. Bu işlem esnasında preparatların altından ateşle kaynamayacak şekilde üzerinden buhar çıkana kadar fikse edildi. Bu şekilde bakteri porlarının açılıp karbol fuksinin hücre içine alınması sağlanmış oldu. Daha sonra preparatlar çeşme suyuyla yıkandı. Üzerine asit-alkol karışımı döküldü ve 2 dakika beklenildi. Hücre duvar yapısında %70 yağasiti bulunduran Mikobakteri türleri asit-alkole dirençli oldukları için bu esnada karbol fuksini hücre içerisine alıp geri bırakmazken diğer bakterilerin ise bu boyayı bırakmaları ve ardındaki yıkama işleminden sonra zıt boya olan metilen mavisi boyasıyla da kontaminasyon olarak nitelediğimiz bu bakterilerin boyanması sağlandı. Metilen mavisiyle boyama işlemi 30-45 saniye arasında tutuldu. Bu işlemden

sonra da her işlemten sonra olduğu gibi çeşme suyuyla yıkama işlemi uygulandı ve hava da kurumaya bırakılan preparatlar kuruduktan sonra 100'lük objektifte immersiyon yağı (sedir yağı) yardımıyla incelendi.

3.2.2. Kültür Ortamında İzolasyon

Kültür ortamında izolasyon için mikobakteriyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan LJ agar besiyeri ve 7 mL'lik modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 Broth içeren BACTEC MGIT 960 otomatize sistemi kullanıldı.

Kültürde izole edildikten sonra, MTBK ve tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) ayırımı için ise İmmünokromatografik TB Ag MPT64 kart testi yapıldı. MPT64(-) bulunan örnekler için TDM doğrulanması açısından p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen / para nitro benzoik asit (NAP/p-NBA) testi kullanıldı.

3.2.2.1. Lowenstein-Jensen (LJ) Agarda Kültür

Dekontaminasyon-homojenizasyon ve konsantrasyon işlemlerinden sonra rutinde ilk kültür yöntemi olan LJ agar içerisinde 0,3 ml oranında ekim yapılan örnekler daha sonra 6-8 hafta (ortalama 42 gün) boyunca 37°C de inkübe edildi. Üreme tespit edilen LJ'lerle MGIT'lar arasındaki en büyük fark ise agarlı besiyerlerinin hemen hepsinde ortak özellik olan bakterilerin kromatik özelliklerini yansıtmalarıdır sıvı besiyerlerinde ise çoğunlukla bu mümkün olamamaktadır.

3.2.2.2. BACTEC MGIT 960 Sisteminde Kültür

Dekontaminasyon-homojenizasyon ve konsantrasyon işlemlerinden sonra örnekler 0,5 ml oranında rutinde ikinci kültür yöntemi olan MGIT'a ekildikten 6-8 hafta (ortalama 42 gün) sonra üreme tespit edilene kadar 37 °C de inkübe edildi. 42 günün sonunda pozitif sonuç vermeyen örnekler negatif kabul edilip, MGIT EPİCENTER sisteminde pozitif sonuç veren örneklere ise Tüberküloz kompleksi (MTBK) ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) ayırımı için immünokromatografik TB Ag MPT64 kart testi ve gerektiğinde NAP/p-NBA testi uygulandı.

3.2.2.3. İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Kart Testi

MTBK türlerinin hücre yapısında bulunan 23 kDa ağırlığındaki proteinleri emdirilmiş olan MPT64 kart (Becton Dickinson, ABD) testine MGIT kültür ortamında üreyen mikobakteri kolonilerinden 0,1 ml alınıp teste eklendi ve 15 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda sadece kontrol çizgisinin çıkması tüberküloz dışı TDM türlerinin varlığını gösterirken, kontrol çizgisiyle beraber TB çizgisindeki ufak bir belirti ise MTBK türlerinin varlığının olabileceğini gösterdi (Şekil 3.1). Kolonilerin MGIT besiyerinden elde edilemediği durumlarda ise LJ agarda üremiş koloniler kullanılarak temin edildi.



Şekil 3.1 Mpt64 kart testi a: TB potitif, b: TB negatif, c:Geçersiz sonuç

3.2.2.4. P-Nitro- α -Asetilamino- β -Hidroksi-Propiofen / Para Nitro Benzoik Asit (NAP/p-NBA) Testi Yorumu ve Hazırlanışı

BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde 42 güne kadar inkübe edilmiş ve bu süre içerisinde pozitiflik vermiş örneklerin ARB işlemleri sonrasında pembe-kırmızı basillerin görülmesi ve MPT64(-) çıkması halinde TDM doğrulanması için NAP/p-NBA testi uygulandı. Kolonilerin MGIT besiyerinden elde edilemediği durumlarda ise LJ agarda üremiş koloniler kullanılarak temin edildi. Bu sistemde Growth Control (GC) MGIT tüpünün Growth Unit'i (GU) 400'e ulaştınca (bu sonuç en fazla 12 gün içinde gerçekleşir)

pozitiflik sinyali veren örnekler değerlendirilmeye alındı. Bu testin sonucuna göre yorumu ise; NAP/p-NBA test tüpünün $GU \leq 10$ ise hassas olması göz önüne alarak, bu miktardan küçük üreme konsantrasyonunun MTBK olarak değerlendirilirken, bu değerden yüksek konsantrasyon değeri ise dirençli yani TDM şeklinde yapıldı (Çizelge 3.1.).

500 mcg/ml konsantrasyonunda p-NBA hazırlanışı;

Bir tüpte 1 ml HCL 5 ml distile su içinde çözüldü.

Farklı bir tüpte de 0,5 gr NaOH 5 ml distile su içinde çözüldü.

1- Öncelikle 80 ml distile su içine 4 gr p-NBA (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) ve 1 gr NaOH parçacıkları eklendi. Solüsyon iyice çözüldükten sonra rengin sarı olması beklendi.

2- pH indikatörü olarak kullanılacak 1 damla Phenolphthalein damlatıldı. Rengin pembeye dönmesi beklendi.

3- Renk tekrar sarı oluncaya kadar (pH nötr) önceden hazırlanmış olan dilüe HCL'den 3-4 damla damlatıldı. HCL'yi damlattıktan sonra oluşan beyaz çökelti (tuz çözeltisi) yok oluncaya kadar karıştırıldı. Karıştırıldığı halde beyaz parçaların kaybolmaması ise ortamın fazla asidik olduğunu gösterdi. Bunun üzerine dilüe NaOH'den birkaç damla daha damlatıldı ve tekrar karıştırıldı. Fazla NaOH eklendiği durumda da rengin tekrar pembeye döndüğü görüldü. Final solüsyon berrak sarı renge gelene kadar işleme devam edildi ve berrak sarı olunca işleme son verildi.

4- Son olarak son hacim 100 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

5- Hazırlanan solüsyon küçük şişelere bölünerek 120°C 'de 10 dk otoklavlandı.

$2 - 8^{\circ}\text{C}$ de 2 ay stabil bir şekilde kullanıldı.

3.2.2.4.1. NAP/P-NBA Testinin Uygulanışı

1- İki MGIT tüpünün birincisi Growth Control (GC) ikincisi NAP/p-NBA tüpü olarak barkotlandı ve hasta kaydı yapıldı.

2- GC ve NAP/p-NBA tüpleri içerisine Growth Supplement+MGIT PANTA Antibiyotiği (çözülmüş) karışımından 0,5'er ml eklendi.

3- NAP/p-NBA tüpü içerisine 0,1 ml p-NBA reaktif eklendi.

4- ARB boyanmış basillerin bulunduğu MGIT Tüpünden 1/4 oranında steril distile su ile sulandırılıp hazırlanmış süspansiyonundan her iki tüpe 0,5 ml ekim yapıldı.

5- İkili barkod taşıyıcılarına GC tüpü sola, NAP/p-NBA şişesi sağa yerleştirildi.

6- Barkod okutularak cihaza yerleştirildi.

7- 12 günün sonunda yorumlamaya geçildi.

Çizelge: 3.1. NAP/p-NBA test sonucu ve immünokromatografik TB Ag Mpt64 kart test sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi.

NAP/p-NBA Test Sonucu	İmmünokromatografik TB Ag Mpt64 Kart Test Sonucu	
	Tek Çizgi (I)	İki Çizgi (II)
Tek Tüp (I)	Geçersiz	MTBK
İki Tüp (II)	TDM	Koenfeksiyon

3.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri (ADT)

Rutinde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) türlerinin ADT'leri MGIT besiyerinden elde edilen kolonilerle yapılırken, çoğu bu ilaçlara doğal dirençli kabul edilen TDM türlerinin ADT'leri ise (ikinci seçenek ilaçlar göz önüne alınarak) LJ agardan elde edilen koloniler kullanılarak değerlendirildi. ADT için LJ-APD yöntemi uygulandı.

Çalışmamız dahilinde LJ agarda üremiş kolonilerden 3-4 koloni alınarak 3 ml steril serum fizyolojik tuzlu suda iyice ezilerek McFarland 1 bulanıklığa erişinceye kadar getirildi. Bunun sonrasında antibiyotik konsantrasyonları belirlenip hazırlanan LJ besiyerlerine ekimler yapıldı.

3.2.3.2.1. LJ Besiyerinin Hazırlanması

1. LJ besiyerinin tuz içerikleri

Monopotasyum fosfat (KH ₂ PO ₄)	2.4 gr
Magnezyum sülfat	0.24 gr
Magnezyum sitrat	0.6 gr
Asparajin tuzları	3.6 gr

2. Tuzlar steril bir erlenmayer içerisine alındı ve üzerine 600 ml distile su ilave edildi.

3. Tuzların çözülmesi için 121 °C'deki otoklavda 15 dk bekletilip daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

4. Taze, iri boy 25 adet yumurtanın dış kabuğu iyice fırçalanarak temizlendi.

5. Yumurtalar alkol veya UV lambası yardımıyla 1 gece boyunca steril edildi.

6. Yumurtalar steril bir balona tek tek tüm şekilde kırılıp homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı.

7. Daha önceden hazırlanmış tuz karışımına önceden otoklavlanıp soğutulmuş 12 ml gliserol ilave edildi.

8. Hazırlanmış olan solüsyona % 2'lik malaşit yeşilinden 50 ml ilave edildi. (modifiye edilmiştir)

9. Önceden hazırlanmış olan yumurta karışımı steril bir bezden geçirilerek filtre edildi ve hazırlanmış olan solüsyona 1000 ml ilave edildi ve çalkalanarak karıştırıldı.

10. Hazırlanan karışımın yani besiyerinin pH değeri 6.8-7 civarında olmasına dikkat edildi.

11. Hazırlanan karışımın bir kısmı kontrol besiyeri olarak ilaçsız şekilde steril tüplere 6'şar ml döküldü.

12. Kalan besiyerine ilaçlar belirlenen miktarlarda ilave edildi ve üzeri etiketlenmiş tüplere 6'şar ml şeklinde döküldü.

13. Bu tüplerin hepsi yatık bir şekilde koagülatöre (pastör fırınına) konuldu. 80°C'de 1 saat koagüle edildi. Bu pişirme ve aynı zamanda sterilizasyon işlemi 3 gün üst üste tekrarlandı (antibiyotiksiz besiyerleri için).

14. 18-24 saat 37 °C'de sterilit kontrolü yapıldıktan sonra ekim yapılincaya kadar 2 -8 °C'de buzdolabında saklanır.

3.2.3.2.2. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz LJ Besiyerlerinin Döküm İşlemi ve İlaç Konsantrasyonları

LJ içerikleri eklenmiş son karışım 5'i ilaçlı, 2'si ilaçsız 700'er ml olmak üzere 7 kısma ayrıldı. Öncelikle iki kısmı ilaçsız kontroller olarak kullanılmak üzere aşağıdaki şekilde hazırlandı. Her burgu kapaklı tüpe 6'şar ml olmak üzere dökülüp 85°C'de 2 saat aralıklı kontroller şeklinde pastör fırınında pişirildi ve bu işlem 2 gün daha üst üste 1'er

saat olmak koşuluyla tekrarlandı. Besiyerleri pişirmenin akabinde örneklerin ekilmesinden önce buzdolabına kaldırıldı.

Geri kalan 5 kısımdan, son konsantrasyonlar amikacin sulfatı (AMK) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) için 32 µg/ml, clarithromycin (CLA) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) için 16 µg/ml, moxifloxacin hydrochloride (MOX) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) için 2 µg/ml, doxycycline hyclate (DOX) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) için 4 µg/ml ve son olarak trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) için ise 64 µg/ml olacak şekilde eklenerek ilaçlı besiyerleri sırasıyla aşağıdaki şekilde hazırlandı.

İlk 700 ml'lik karışım içerisinde AMK ilacından suda çözülerek hazırlanan 50mg/ml'lik solüsyondan 448 µl eklenerek besiyerinde homojen bir şekilde dağılına kadar karıştırıldı. Bu karışım da 6'şar ml olmak üzere dökülüp 85°C'de 2 saat aralıklı kontroller şeklinde pişirildi. Bu işlem ilaçsız besiyerindeki gibi üst üste pişirme şeklinde tekrarlandı.

CLA için ayrılan 700 ml içerisinde CLA ilacından asetonda çözülerek hazırlanan 50mg/ml'lik solüsyondan 224 µl eklenerek besiyerinde homojen bir şekilde dağılına kadar karıştırıldı.

MOX için ayrılan 700 ml içerisinde MOX ilacından suda çözülerek hazırlanan 24mg/ml'lik solüsyondan 58 µl eklenerek besiyerinde homojen bir şekilde dağılına kadar karıştırıldı.

DOX için ayrılan 700 ml içerisinde DOX ilacından suda çözülerek hazırlanan 50mg/ml'lik solüsyondan 56 µl eklenerek besiyerinde homojen bir şekilde dağılına kadar karıştırıldı.

Son olarak; TMP-SMX için ayrılan 700 ml içerisinde dimethyl sulfoxide (DMSO) ile çözülmüş 100mg/ml'lik hazır TMP-SMX solüsyonundan (cotrimoxazole; 1 trimethoprim: 5 sulfamethoxazole) 538 µl eklenerek besiyerinde homojen bir şekilde dağılına kadar karıştırıldı.

AMK eklenmiş besiyerinin pişirimi işlemindeki gibi diğer 4 ilacın ekli olduğu besiyerleri de pişirilip buzdolabına kaldırıldı.

3.2.3.2.3. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz LJ Besiyerlerine Ekim İşlemi

Antibiyotiksiz LJ besiyerine Mcfarland 1 bakteri süspansiyonu 10^{-2} ve 10^{-4} olacak şekilde sulandırılarak 0,3'er ml şeklinde tüm örneklerin ekimleri yapıldı. 37 °C'de inkübasyona bırakıldı ve 7, 10 ve 14'üncü günlerde incelendi.

Her 5 antibiyotiğin de ekli oldukları besiyerilerine Mcfarland 1 bakteri süspansiyonları 10^{-2} olacak şekilde sulandırılarak 0,3'er ml şeklinde tüm örneklerin ekimleri yapıldı. 37 °C'de inkübasyona bırakıldı ve 7, 10 ve 14'üncü günlerde incelendi. Bu süre sonunda üremeyi 100 kattan daha fazla engelleyenler duyarlı, 100 kattan daha az engelleyenler dirençli olarak yorumlandı¹¹³ (üreme oranı %1; dirençli).

3.3. TDM İzolatlarının DNA Dizi Analizi ile Genotipik İdentifikasyonu

Kültür ortamında izole edilen bakteri kolonilerinden DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra *Mycobacterium* türleri için spesifik olan 441 bp uzunluğunda *hsp65* gen bölgesi amplifiye edildi. Agaroz jel elektroforezi ile *hsp65*(+) bulunan örneklerde DNA Dizi Analizi yöntemi ile tür düzeyinde identifikasyon yapıldı.

3.3.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için MICKLE cihazında mekanik ekstraksiyon protokolü uygulandı.

Fenotipik olarak TDM izole edilen MGİT besiyerlerinden 0,5 ml alınarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine koyuldu. MGİT kültürünün değerlendirilemediği durumlarda LJ besiyerinde üretilip fenotipik olarak TDM olduğu belirlenen koloniler 4 ml steril distile su içerisinde süspanse edilerek, ekstraksiyon için 0,5 ml kullanıldı. İşlemler aşağıdaki sıraya göre gerçekleştirildi:

- 1- Bakteri süspansiyonları 3000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 2- 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine hasta barkot kayıtları yapıldı.
- 3- Santrifüj edilen örneğin süpernatant kısmının bir bölümü döküldü.
- 4- Daha sonra pastör pipetiyle pellet kısmından 0,5 ml alınıp ilgili hasta barkotun olduğu mikrosantrifüj tüpüne eklendi.
- 5- Önceden 80 °C'ye getirilmiş ısı bloğunda 30 dakika bekletildi.

6- Sonra örnekler 12700 rpm'de (15000 g (Eppendorf Soğutmalı Micro santrifüj cihazında, GERMANY)) 15 dakika santrifüj edilip üsteki sıvı dikkatle döküldü.

7- Kalan pellet üzerine 500µl Tris-EDTA (TE) Buffer eklendi ve pipetaj işlemi yapıldı.

8- 12700 rpm (15000 g) 15 dakika santrifüj edilip üsteki sıvı dikkatle döküldü.

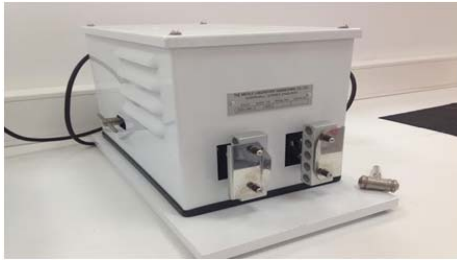
9- Pellet üzerine 250µl TE Buffer eklendi ve pipetaj yapıldı.

10- Pipetaj akabinde 100-150 hacimde cam boncuk eklenip 2 dakika Mickle cihazında mekanik işleme tabi tutuldu.

11- 12700 rpm'de (15000 g) 15 dakika santrifüj edildi.

12- Santrifüj işlemi akabinde üstte ki sıvı DNA olarak alındı.

13- -20 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.2. Mickle cihazı.

3.3.2. Mikobakteri'lerin *hsp65* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Mikobakter'lerin *hsp65* genine ait spesifik bölgeyi hedef alan TB11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) ve TB12 (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT) primerleri kullanılmıştır. Amplifikasyon 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, herbir dNTP'den 200 µM, herbir primerden 25 pmol, 2.5 U *Taq* polymerase ve 5 mikrolitre kalıp DNA içeren toplam 50 mikrolitre PCR karışımında gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon aşamaları aşağıdaki şekilde tamamlanmıştır:

94 °C'de 1 dak. - denaturasyon	} 45 döngü
60 °C'de 1 dak. - bağlanma (annealing)	
72 °C'de 1 dak. - uzama (extension)	
72 °C'de 10 dak. - son uzama (extension)	

3.3.2.1. Agaroz Jel Elektrofozi

Ekstraksiyon ve amplifikasyonun doğru bir şekilde gerçekleştiğini test etmek amacı ile agaroz jel elektroforezini kullanıldı. 100ml 1xTBE ve 2gr agaroz ile kaynatılarak %2'lik agaroz jel hazırlandı. Oda şartlarında yaklaşık 50-60°C'ye kadar soğuyan agaroz jel üzerine 10 µg/ml konsantrasyonda Etidyum Bromür'den 5µl eklendi. Agaroz jel içerisinde Etidyum bromür iyice karıştırıldıktan sonra taraklar yerleştirilerek jel kasetine döküldü. Oda ısısında katılaştıran jelden tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve içerisinde 1xTBE tamponu olan tank içerisine yerleştirildi. Jel üzerindeki kuyulara 16µl örnek ile 4µl loading buffer karıştırılarak yükleme yapıldı. İlk ve son kuyuya marker yüklendi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus). Tank güç kaynağına (biorad) bağlandı. 120 volt akımda 1 saat yürütme işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra DNA bantları jel görüntüleme sistemi (Gel logic 1500 imaging system ayırım gücü: 1708X1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) ile incelendi. Yaklaşık 300-400 bp aralığındaki bantlar pozitif olarak kabul edildi ve dizi analizi işlemine alındı.

3.3.1.1.1. 10xTBE Tamponunun Hazırlanması

108 gr Tris-Base

55 gr Borik asit

8.3 gr EDTA

eritilip distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı (pH: 8.8).

3.3.1.2. Uygulama

Uygulama aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

1. 10xTBE 1xTBE şeklinde sulandırıldı.
2. Eridiğinde % 2'lik jel oluşturacak şekilde agaroz tartılıp bir balon içerisine konuldu.
3. Üzerine 1xTBE tamponu (% 2'lik jel oluşturacak hacimde) ilave edilerek mikrodalga fırında eritildi.
4. Bir süre bekleterek (60 °C'nin altına düşmeyecek şekilde) soğutuldu.

5. İçerisine etidyum bromid (30 ml'lik jel için 3-4 µl (10 mg/ml'lik stok) yeterlidir) eklenerek karıştırıldı.
6. Önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.
7. Oda sıcaklığında 20-30 dk bekletilerek katılaşması sağlandı.
8. Jel kalıbı tanka (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) yerleştirilerek taraklar yavaşça çıkarıldı.
9. Örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 3 µl yükleme tamponu (% 20 sükröz, % 0.25 brom fenol mavisini (1xTBE ile hazırlanmış)) ile karıştırılarak, açılan her kuyuya bir örnek olacak şekilde konuldu (İlk kuyuya DNA markeri yüklenir).
10. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) (Şekil 3.1) çalıştırılarak 80 mA – 120 V akım verildi.
11. Brom fenol mavisinin migrasyonu takip edilerek jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.
12. Jel tanktan çıkarıldı ve Jel Logic 1500 Imaging System (Kodak, New) jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek incelendi.

3.3.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Dizi analizinden önce ortamdan reaksiyonu etkileyecek olan nükleotit, primer ve diğer kimyasalların uzaklaştırılması amacı ile PCR ürünleri saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi "SentroPure® PCR ürünü saflaştırma ve jelden DNA ekstraksiyon kiti (SENTROMER®)" saflaştırma sistemi ile protokole önerildiği şekilde saflaştırıldı.

1. Steril 1,5 ml tüp içerisine, her 1µl PCR ürünü için 4 µl SG solüsyonu (DNA immobilizasyonunu sağlar, pH 6,6) eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
2. Karışım SentroSpin kolonuna aktarıldı, 13000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü.
3. SentroSpin kolonuna 500µl solüsyon SW (DNA'nın arınmasını sağlar, pH 7,5) eklendi, 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü. İşlem birkez daha tekrarlandı.

4.SentroSpin kolon 1 dakika boş olarak santrifüj edildi ve kalan etanol uzaklaştırıldı.

5. Sentrospin kolonu 1,5 ml'lik temiz mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek başlangıç PCR ürünü miktarı kadar solüsyon SE (DNA'nın toplanmasını sağlar, pH 8,5) kolonun tam ortasına gelecek şekilde eklendi. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek saf DNA toplandı.

Bu saflaştırılmış DNA örnekleri dizi analizi için kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.3.4. Dizi Analizi Çalışması

Burada örneklerin, "ABI Prism 310 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) otomatize sistemi kullanılarak, "F.Sanger'in dideoksi zincir sonlandırma yöntemi" prensiplerine göre dizi analizi yapılacaktır.

Dizi analizi ile elde edilen veriler, "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) web sayfasındaki BLAST programı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gen bankası veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma için "nucleotide-nucleotide blast" (blastn) programı seçilmiştir.

İlk olarak saf haldeki PCR ürünlerine Cycle sequencing uygulaması yapıldı. Bu aşamada forward primerler kullanılarak hem dNTP hem de ddNTP içeren reaksiyon karışımı ile tek zincirli amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. İşlem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirildi. Her örnek için aşağıdaki karışım hazırlandı.

Ready reaxion mix (RR-100) 5X	4µl
Squencing Buffer 5X	4µl
Hsp65 f	4µl
Saf su	4µl
Saf PCR ürünü	4µl
Toplam hacim	20µl

Cycle sekans için hazırlanan örnekler için termal cycle cihazında aşağıdaki ısı döngüleri ayarlandı.

96°C de	10 sn
50°C de 5 sn	25 döngü
60°C de	4 dk

Cycle sekans ürünleri, sekans analiz cihazına yüklenmeden önce tekrar saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi için ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research) protokolünde önerildiği şekilde kullanıldı;

1. 5-20 µl cycle sekans ürününe 240 µl “Sequencing Binding Buffer” eklendi.
2. Karışım Zymo-Spin™ IB kolona aktarıldı.
3. 13,000 rpm (15000 - 16000 x g) de 30 saniye santrifüj edildi.
4. Spin kolona 300 µl “Sequencing Wash Buffer” eklendi ve 13000 rpm (15000 - 16000 x g) de 30 saniye santrifüj edildi.
5. DNA' yı toplamak için kolona, 20 µl %20'lik formamid eklendi ve kolon 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek 13000 rpm (15000 - 16000 x g) de 15 saniye santrifüj edildi. Elde edilen ultrapüre DNA sekans cihazına yüklemeye hazırды.

4. BULGULAR

TDM türlerinin bölgemizdeki sıklığının ve direnç paterninin belirlenmesini hedef alan bu çalışmada; 2012 Kasım - 2014 Eylül tarihlerinde ÇÜ THAUM ve Bölge Tüberküloz Laboratuvarına tüberküloz şüphesiyle gönderilen 21918 klinik örnek değerlendirmeye alınmış ve fenotipik incelemeler sonucu 76 hastaya ait 96 (% 0.4) örnek TDM olarak değerlendirilmiş, ancak DNA Dizi Analizi yöntemi ile tür düzeyinde identifikasyon sonucunda bunlardan üçünde TDM identifiye edilememiştir. Bu üç suştan birinin *M. bovis complex*, diğerlerinin ise *Nocardia farcinica* ve *Streptomyces griseus* olduğu tespit edilmiştir. DNA Dizi Analizi yöntemi ile TDM olduğu doğrulanan ve tür identifikasyonu yapılan örneklerden 44'ünde hızlı üreyen, 47'sinde ise yavaş üreyen TDM türleri, ikisinde ise koenfeksiyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Kültür ortamında izolasyon sonucunda TDM tanısı alan 76 hastadan ikisinin üçer, birinin beş, ikisinin yedişer, kalanlarının ise birer örneği olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2).

Bölgemizde en sık izole edilen TDM türü % 24,7 (23/93) ile *M. abscessus* iken, bunu % 11,8 (11/93) ile *M. intracellulare*, % 10,8 (10/93) ile *M. simiae*, % 8,6 (her üçünde de 8/93) ile *M. avium complex*, *M. gordonae* ve *M. lentiflavum* türleri izlemiştir. Diğer türlerin dağılımı Çizelge 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir.

İzolatlardan birinin direnç durumu tespit edilemeden DNA Dizi Analizi ile *M. bovis complex* olduğu anlaşıldığından, APD Test çalışmasına dahil edilmemiştir. *Nocardia farcinica*'nın Clarithromycin'e, *Streptomyces griseus*'un ise Doxycycline'e dirençli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1).

TDM suşlarında en çok direncin % 17,2 (her ikisinde de 16/93) ile Doxycycline ve Moxifloxacin'e karşı geliştiği tespit edilmişken, direnç oranları Trimethoprim-Sulfamethoxazole için % 7,5 (7/93), Amikacin için % 6,5 (6/93), Clarithromycin için ise % 5,4 (5/93) olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Hızlı üreyen 44 TDM suşunda en çok direncin Doxycycline'e (% 22,7), en az direncin de Clarithromycin'e (% 2,3), yavaş üreyen 47 TDM suşunda ise en çok direncin Moxifloxacin'e (%25.5), en az direncin de Amikacin'e (% 2,1) karşı geliştiği görülmüştür.

LJ-APD testi ile belirlenen Antibiyotik direnç durumunun türlere dağılımı Çizelge 4.1 ve 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Fenotipik incelemede TDM olarak değerlendirilen 96 suşun DNA Dizi Analizi ve LJ-APD Test sonuçlarının karşılaştırılması.

Grup*	Tür	Örnek Sayısı	LJ-APD Test Sonuçları**														
			Örnek Sayısı														
			AMK			CLA			DOX			MOX			TMP-SMX		
R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S			
RGM	<i>M. abscessus</i>	21	3	0	18	0	1	20	5	3	13	0	0	21	1	1	19
	<i>M. abscessus subsp. bolletii</i>	4	0	0	4	0	0	4	1	2	1	0	1	3	0	0	4
	<i>M. bolletii</i>	5	0	1	4	1	0	4	2	0	3	1	0	4	1	0	4
	<i>M. brisbanense</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
	<i>M. chelonae</i>	2	1	0	1	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2
	<i>M. elephantis</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
	<i>M. fortuitum</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
	<i>M. holsaticum</i>	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
	<i>M. mageritense</i>	3	0	0	3	0	0	3	0	0	3	1	0	2	0	0	3
	<i>M. massiliense</i>	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
	<i>M. monacense</i>	2	1	0	1	0	0	2	0	1	1	0	2	0	0	0	2
	<i>M. phocaicum</i>	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2
Toplam	44	5	1	38	1	1	42	10	6	28	4	3	37	2	1	41	
SGM	<i>M. avium complex</i>	8	1	0	7	0	0	8	0	0	8	3	1	4	1	0	7
	<i>M. terrae complex</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
	<i>M. goodnae</i>	8	0	0	8	3	0	5	4	0	4	1	0	7	1	0	7
	<i>M. intracellulare</i>	11	0	1	10	0	0	11	0	1	10	4	0	7	1	2	8
	<i>M. kansasii</i>	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2
	<i>M. lentiflavum</i>	8	0	0	8	1	0	7	1	0	7	3	0	5	1	0	7
	<i>M. simiae</i>	9	0	0	9	0	0	9	1	0	8	1	0	8	0	1	8
	Toplam	47	1	1	45	4	0	43	6	1	40	12	1	34	4	3	40
Mix	<i>M. simiae</i> + <i>M. abscessus</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
	<i>M. abscessus</i> + <i>Nocardia farcinica</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Diğer	<i>M. bovis complex</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Nocardia farcinica</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
	<i>Streptomyces griseus</i>	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Genel Toplam	96	6	4	85	6	2	87	17	8	70	16	6	73	7	5	83	

*RGM=Hızlı üreyen mikobakteriler; SGM=Yavaş üreyen mikobakteriler; Mix=Koenfeksiyon

**AMK=Amikacin; CLA=Clarithromycin; DOX=Doxycycline; MOX=Moxifloxacin; TMP-SMX=Trimethoprim-Sulfamethoxazole; R=Dirençli; I=Orta derecede duyarlı; S=Duyarlı.

İki örneğin DNA Dizi Analizi sonucunun güvenilir çıkmaması üzerine, bu örnekler LJ besiyerlerine pasajlanarak saf kültürler izole edilmeye çalışıldı ve yeniden dizi analizleri yapıldı, fakat LJ-APD testleri tekrarlanmadı. Birinde *M. simiae* ve *M. abscessus*, diğerinde de *M. abscessus* ve *Nocardia farcinica* olmak üzere ikisinde de koenfeksiyon olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.2. Birden fazla örneği incelenen hastalara ait sonuçların dağılımı.

Hasta	Örnek Tarihi	Hastane veya VSD*	ARB	Üreme Tipi**	LJ-APD sonucu***					DNA Dizi Analizi
					AMK	CLA	DOX	MOX	TMP-SMX	
1.	17.03.2014	Çukurova Devlet	(-)	SGM	S	S	S	S	I	<i>M. intracellulare</i>
	20.05.2014	Çukurova Devlet	(-)	SGM	S	S	S	S	I	<i>M. intracellulare</i>
	18.06.2014	Ceyhan	(-)	SGM	S	S	S	R	S	<i>M. intracellulare</i>
2.	10.03.2014	Çukurova Devlet	(+)	SGM	S	S	S	R	S	<i>M. intracellulare</i>
	16.04.2014	Karşıyaka	(+)	SGM	I	S	S	S	R	<i>M. intracellulare</i>
	15.07.2014	Karşıyaka	(-)	SGM	S	S	S	S	S	<i>M. intracellulare</i>
3.	20.01.2014	Çukurova Devlet	(-)	RGM	I	S	R	S	R	<i>M. bolletii</i>
	20.05.2014	Çifteminare	(-)	RGM	S	S	S	S	S	<i>M. bolletii</i>
	20.05.2014	Çukurova Devlet	(-)	RGM	S	S	S	S	S	<i>M. bolletii</i>
	03.07.2014	Çifteminare	(+)	RGM	S	S	R	S	S	<i>M. bolletii</i>
	16.07.2014	Çifteminare	(+)	RGM	S	R	S	R	S	<i>M. bolletii</i>
4.	18.03.2014	Karşıyaka	(-)	SGM	S	S	S	R	S	MAC****
	20.03.2014	Çukurova Devlet	(-)	SGM	S	S	S	S	S	MAC
	16.04.2014	Karşıyaka	(+)	RGM	S	S	S	S	S	<i>M. abscessus</i>
	24.04.2014	Karşıyaka	(-)	SGM	S	S	S	R	S	MAC
	28.04.2014	Çukurova Devlet	(-)	SGM	S	S	S	I	R	MAC
	07.05.2014	Karşıyaka	(-)	SGM	S	S	S	S	S	MAC
	16.07.2014	Karşıyaka	(-)	RGM	R	S	S	S	S	<i>M. abscessus</i>
5.	14.11.2013	Antakya	(+)	SGM	S	S	S	R	S	<i>M. intracellulare</i>
	27.11.2013	Antakya	(+)	RGM	R	S	R	S	S	<i>M. abscessus</i>
	05.02.2014	Antakya	(+)	RGM	S	S	S	S	S	<i>M. abscessus</i>
	05.02.2014	Antakya	(+)	RGM	S	S	R	S	S	<i>M. abscessus</i>
	21.03.2014	Antakya	(+)	RGM	S	S	I	S	I	<i>M. abscessus</i>
	21.03.2014	Antakya	(+)	RGM	S	S	S	S	S	<i>M. abscessus</i>
	27.03.2014	Antakya	(+)	RGM	S	S	R	S	S	<i>M. abscessus</i>

*VSD=Verem Savaş Dispanseri

**RGM=Hızlı üreyen mikobakteriler; SGM=Yavaş üreyen mikobakteriler

***AMK=Amikacin; CLA=Clarithromycin; DOX=Doxycycline; MOX=Moxifloxacin; TMP-SMX=Trimethoprim-Sulfamethoxazole; R=Dirençli; I=Orta derecede duyarlı; S=Duyarlı.

****MAC=*Mycobacterium avium complex*.

5. TARTIŞMA

Mycobacterium tuberculosis complex ile TDM türlerinin mikroskopik inceleme ile ayırt edilmesi mümkün olmadığından ve TDM türlerinin büyük çoğunluğu klasik anti-TB ilaçlara karşı dirençli olduğundan, TDM ile infekte hastalarda tedavi etkisiz kalabilmektedir. Bu durumda hem hastaya yararı olmayan bir ilacın gereksiz yere kullanılması, hem de hastanede kalış süresinin uzaması önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle tedaviye başlanmadan önce mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır^{1,2}.

Uzun yıllar mikobakterilerin mikrobiyolojik tanımlaması geleneksel biyokimyasal testler ile yapılmaya çalışılmıştır^{1,2,8}. Bu testler gerek yoğun emek istemeleri, gerekse sık karşılaşılan TDM türlerinin çoğunun tanımlanmasında yetersiz kalmaları sebebiyle etkin olarak kullanılamamışlardır¹.

Çalışmamızda 21918 klinik örnek değerlendirmeye alınmış ve fenotipik incelemeler sonucu 76 hastaya ait 96 (% 0,4) örnek TDM olarak değerlendirilmiş, bu hastalardan ikisinin üçer, birinin beş, ikisinin yedişer, kalanlarının ise birer örneği olduğu görülmüştür.

Bölgemizde en sık izole edilen TDM türü % 24,7 (23/93) ile *M. abscessus* iken, bunu % 11,8 (11/93) ile *M. intracellulare*, % 10,8 (10/93) ile *M. simiae*, % 8,6 (her üçünde de 8/93) ile *M. avium complex*, *M. gordonae* ve *M. lentiflavum* türleri izlemiştir. Gunaydin ve ark'nın 2013 yılında Ülkemizin dört farklı bölgesinden izole ettikleri 90 TDM suşunu 16S rDNA ve hsp65 gen bölgelerinin dizi analizi ile inceledikleri multidisipliner bir çalışma sonucunda 17 farklı tür tanımlamış, en sık izole ettikleri türlerin 21 (% 23,3) suş ile *M. gordonae*, 13 (% 14,4) suş ile *M. abscessus*, 9 (% 10) suş ile *M. lentiflavum*, 8 (% 8,9) suş ile de *M. fortuitum* olduğunu bildirmişlerdir⁹². Kılıçaslan ve ark'nın 2013 yılında İstanbul'da *hsp65* Restriksiyon Enzim Analizi yöntemi kullandıkları retrospektif bir çalışmada 2004-2010 tarihleri arasında 42 TDM hastasından en sık *M. abscessus* (% 33,3), *M. avium* (% 21,4) ve *M. kansasii* (% 19) türlerini izole etmiş, bu izolatların anti-TB ilaçlara karşı duyarlılık testlerini proporsiyon yöntemi ile incelemiş, bu ilaçlara yüksek oranda dirençli olduklarını bildirmişlerdir⁹³. Albayrak ve ark'nın 2012 yılında Ankara'da

yaptıkları retrospektif bir çalışmada 2009-2010 tarihleri arasında en sık *M. fortuitum* (% 33,3), *M. abscessus* (% 18,7), *M. gordonae* (% 10,7) ve *M. avium* (% 8) izole etmişlerdir⁹⁴.

Bölgemizdeki tür dağılımının diğer bölgelerle *M. fortuitum* dışında çok uyumlu olduğu görülmüştür. Bizde *M. fortuitum*'un yalnızca bir örnekten izole edilmesi coğrafi farklılıkla beraber yöntem uygulamasındaki farklılığa da bağlı olabilir. Ayrıca, spesifik *hsp65* gen bölgesinin dizi analizi ile çalışmamızda bir hastaya ait farklı zamanlardaki beş örneğin tamamında tespit ettiğimiz *M. bolletii*, dört hastada tespit ettiğimiz *M. abscessus subsp. bolletii*, bir hastada tespit ettiğimiz *M. massiliense*, üç hastada tespit ettiğimiz *M. mageritense*, iki hastada tespit ettiğimiz *M. phocaicum*, bir hastada tespit ettiğimiz *M. holsaticum*, bir hastada tespit ettiğimiz *M. brisbanense* tür ve alt türlerinin Ülkemizde izole edildiği daha önce bildirilmemiştir. *M. holsaticum*'u ilk defa Richter E ve ark 2002 yılında Almanya'da, *M. brisbanense*'i de Schinsky ve ark 2004 yılında Avustralya'da izole etmişlerdir⁹⁵. Leao ve ark 2011 yılında *M. bolletii* ve *M. massiliense* türlerinin *M. abscessus subsp. bolletii* olarak adlandırılması önerisinde bulunmuşlardır⁹⁶. Bizim çalışmada üçü de tespit edildi, ancak onları önceki adları ile tanımladık. Fransa'da kistik fibrozis ile infekte olan 1582 hastayı içeren ve TDM'lerin sıklığını belirlemeyi amaçlayan çok merkezli bir çalışma sonucunda TDM türlerinin sıklığı % 6,6 olarak bulunmuştur. *M. abscessus kompleks* (MABSC) (50 hasta) ve *M. avium kompleks* (MAC) (23 hasta) türleri en yaygın türler olarak görülmüş olup, bu iki türden en az birini Amerikan Toraks Derneği'nin bakteriyolojik kriterlerine göre akciğer hastalıklarıyla ilişkilendirmişlerdir. Yeni türler olan *Mycobacterium bolletii* ve *Mycobacterium massiliense* ise MABSC'nin %40'ından sorumlu olarak görülmüştür⁹⁷.

Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada, özellikle AIDS ve immünsüpresif hastalarda yaygın olarak izole edilen TDM dağılımının balgam örneklerinde araştırılması amacıyla tasarlanmıştır. 2009-2010 yılları arasında TDM tanısı alan toplam 75 hastada (30 kadın, 45 erkek) hızlı identifikasyon testi ve aynı zamanda NAP testi uygulandıktan sonra MGIT ve Löwenstein-Jensen (LJ) kültür yöntemlerinde görülen üremeyi TDM(+) olarak değerlendirmişlerdir. Bu hastaların 32'sine ait olan örneklerde *hsp65*-PCR-REA yöntemi ile tür tayini yapılmış olup, radyoloji, bakteriyoloji, eşlik eden hastalıklar ve tedavi sonuçları gibi tıbbi kayıtların incelenmesi, hastaların doğrudan aranması ve tüberküloz

dispanserlerinin verilerine ulaşılması yoluyla da tedavi yöntemlerini uygulamışlardır. Birçok çalışmanın aksine, uygun tedavi ve epidemiyolojik değerlendirme açısından kültüre dayalı yöntemlerin TDM tespiti için önemli olduğunu bildirmişlerdir³⁸.

Önemli bir sağlık problemi olmaya devam eden tüberkülozun hızlı teşhisinin tedavi ve kontrolündeki önemine dikkat çeken bir çalışmada mikobakteri tanımlama ve aynı zamanda ilaç direnç paternini belirleme testi olan multipleks PCR'ın öneminden bahsedilmiştir. *Mycobacterium avium kompleks* (MAC) ve diğer mikobakteri türlerinin tanımlanmasını *hsp65* gen bölgesinin DNA dizi analizi ile onaylanmasının önemine vurgu yapılmıştır⁹¹.

DNA Dizi Analizi yöntemi ile tür düzeyinde identifikasyon sonucunda TDM olmadığı anlaşılan üç suştan birinin *M. bovis complex*, diğerlerinin ise *Nocardia farcinica* ve *Streptomyces griseus* olduğu tespit edilmiştir. DNA Dizi Analizi yöntemi ile TDM olduğu doğrulanan ve tür identifikasyonu yapılan örneklerden 44'inde hızlı üreyen, 47'sinde ise yavaş üreyen TDM türleri, ikisinde ise koenfeksiyon olduğu tespit edilmiştir.

Birinde *M. simiae* ve *M. abscessus*, diğerinde de *M. abscessus* ve *Nocardia farcinica* olmak üzere iki örneğimizde koenfeksiyon olduğu tespit edildi. Klinisyenlerin sıkça karşılaştıkları bir problem, tüberküloz tedavisi altındaki hastadan bir TDM suşunun izole edilmesidir. Jun ve ark. 958 tüberkülozlu hastanın 68'inde (%7,1) bir TDM suşu izole edildiğini rapor etmişlerdir. Yazarlar tüberküloz hastalarında TDM suşu izole edilmesinin nadir bir olay olmadığını belirtmiştir. Ancak bu hastaların tüberküloz tedavisinin tamamlanmasından sonra, özellikle virülan suşlar için, takip edilmesi gerekliliği konusunda görüş birliğine varmışlardır⁸¹.

Çalışmamızda MTBK ile TDM ayırımı için rutin olarak merkezimizde uygulanan İmmünokromatografik TB Ag MPT64 kart testi ile pozitif sonuç alınan örnekler MTBK(+) olarak değerlendirilmiş, negatif sonuç alınan örnekler ise NAP/p-NBA testine tabi tutulmuşlardır. Bu testle pozitif sonuç alınan örnekler TDM olarak değerlendirilmiştir. MPT64(+) örneklere NAP/p-NBA testi uygulamadığımız için MTBC-TDM koenfeksiyonları hakkında gözlem yapmamız mümkün olmamıştır. Ancak, MPT-64(-)/p-NBA(+) sonuç aldığımız ve TDM olarak belirlediğimiz 96 örnekten birinin DNA Dizi

Analizi sonucunda MTBK üyesi olan *M. bovis complex* tanısı alması aslında bahsedilen koenfeksiyonların önemini bir daha vurgulamaktadır.

Genel olarak TDM türleri bağışıklığı baskılanmış kişilerde klinik tablo oluşturmakla beraber, bölgemizde sık görülen ve çoğunlukla kontaminasyon olarak değerlendirilen *M. abscessus* ve *M. simiae* gibi türlerin bağışıklığı baskılanmamış insanlarda da hastalık etkeni olarak izole edildiği birçok çalışma ile gösterilmiştir^{98,99,100,101,102}.

Ayrıca, Çizelge 4.2’de de görüldüğü üzere, farklı hastane veya dispanserden de olsa aynı hastalardan farklı zamanlarda alınan örneklerden genelde aynı türlerin izole edilmesi laboratuvar kontaminasyonunu düşündürmemektedir.

TDM suşlarında en çok direncin % 17,2 ile Doxycycline ve Moxifloxacin’e karşı geliştiği tespit edilmişken, direnç oranları Trimethoprim-Sulfamethoxazole için % 7,5, Amikacin için % 6,5, Clarithromycin için ise % 5,4 olarak bulunmuştur. Hızlı üreyen 44 TDM suşunda en çok direncin Doxycycline’e (% 22,7), en az direncin de Clarithromycin’e (% 2,3), yavaş üreyen 47 TDM suşunda ise en çok direncin Moxifloxacin’e (%25.5), en az direncin de Amikacin’e (% 2,1) karşı geliştiği görülmüştür. Böylece, TDM enfeksiyonlarının tedavisinde genel olarak en uygun ilaçların Clarithromycin ve Amikacin olduğu görülmüştür. Ancak, Amikacin MTBK için önemli bir ikinci seçenek ilaç olduğu için iyi bir identifikasyon ve ADT sonrası Clarithromycin ile birlikte önerilebilir.

Sonuç olarak, LJ-APD testi TDM suşlarında beş antibiyotik için ilk defa uygulanmasına karşın, çalışmamızın sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu ve kullanılan yöntemlerin avantajlı olduğu gözlenmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bölgemizde TDM tür dağılımının ve antibiyotik direnç paterninin belirlenmesi, epidemik potansiyele sahip mikobakteriyel türlere karşı önlem çalışmalarının başlatılabilmesi ve bunun için TDM infeksiyonlarında en çok tercih edilen antibiyotiklerden Moxifloxacin, Amikacin, Clarithromycin, Trimethoprim-Sulfamethoxazole ve Doxycycline'e karşı izolatların duyarlılıklarının Löwenstein Jensen - Agar Proporsiyon Duyarlılık (LJ-APD) testi ile belirlenmesi amacı ile planlanan bu çalışma sonunda;

1. 2012 Kasım - 2014 Eylül tarihlerinde 21918 klinik örnekten fenotipik incelemeler sonucu 96 (% 0,44)'sının, DNA Dizi Analizi yöntemi ile tür düzeyinde identifikasyonu sonucunda ise 93'ünün TDM olarak tespit edildiği,
2. DNA Dizi Analizi yöntemi ile TDM olmadığı tespit edilen üç suştan birinin *Mycobacterium bovis complex*, diğerlerinin ise *Nocardia farcinica* ve *Streptomyces griseus* olduğu,
3. DNA Dizi Analizi yöntemi ile TDM olduğu doğrulanan ve tür identifikasyonu yapılan 93 örnekten 44 (% 47,3)'ünde hızlı üreyen, 47 (% 50,5)'inde ise yavaş üreyen TDM türleri, ikisinde ise koenfeksiyon olduğu,
4. Bölgemizde en sık *Mycobacterium abscessus* (21/93) izole edildiği, bunu sırası ile *Mycobacterium intracellulare* (11/93), *Mycobacterium simiae* (9/93), *Mycobacterium avium complex* (8/93), *Mycobacterium gordonae* (8/93) ve *Mycobacterium lentiflavum* (8/93) türlerinin izlediği,
5. TDM suşlarında en çok direncin Doxycycline ve Moxifloxacin'e karşı (her ikisinde de 16/93), en az direncin ise Clarithromycin'e karşı (5/93) geliştiği görülmüştür.

Sonuç olarak, fenotipik inceleme ile TDM olarak tespit edilen 96 suştan üçünün DNA dizi analizi sonucunda TDM olmadığı tespit edilmesi, özellikle de birinin tüberküloz etkeni olan *Mycobacterium bovis complex* olması sebebiyle DNA Dizi Analizi yönteminin tür identifikasyonunda çok önemli olduğunu göstermektedir. Bu sebeple ön

fenotipik inceleme ile TDM olduğu düşünölen suşların direnç tespitinin LJ-APD yöntemi ile yapılmasının ve mümkünse DNA Dizi Analizi veya tür identifikasyonunda kullanılabilir duyarlı ve özgül bir moleküler yöntemle tür tayininin yapılmasının özellikle dirençli mikobakteri infeksiyonlarının sörveyansı açısından çok önemli olacağı kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Alpaslan A.** Non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonlarında laboratuvar tanı ve duyarlılık testleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. 1.Basım. Otak Form-Ofset Basım San. Tic. AŞ, Samsun, **2003**; s:389-96.
2. **Nolte FS, Metchock, B.** *Mycobacterium*, pp: 400-37. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), Manual of Clinical Microbiology. **1995**, 6th ed. ASM Pres, Washington DC.
3. **Thorel MF, Huchzermeyer HF, Michel AL.** *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. Rev Sci Tech **2001**; 20: 204-18.
4. **Miller N, Infante S, Cleary T.** Evaluation of the LiPA Mycobacteria assay for identification of mycobacterial species from Bactec 12B bottles. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 1915-9.
5. **Falkinham JO** 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculosis mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **1996**; 9: 177-215.
6. **Yüce A.** Nontüberküloz mikobakteri infeksiyonlarının klinik önemi, s: 150-5. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. **2003**, 1.Basım. Otak Form-Ofset Basım San. Tic. AŞ, Samsun.
7. **Chan J, McKittrick JC, Klein RS.** *Mycobacterium gordonae* in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* **1984**; 101: 400.
8. **Sürücüoğlu S.** Tüberküloz basilinin identifikasyonu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. 1.Basım. Otak Form-Ofset Basım San. Tic. AŞ, Samsun, **2003**; s: 300-10.
9. **Ganeswire R, Chui CS, Balan S, Puthuchery SD.** Comparison of Bactec MGIT 960 system and Bactec 460 TB system for growth and detection of mycobacteria from clinical specimens. *Malays J Pathol* **2004**; 26: 99-103.
10. **Claudio Scarparo,* Paolo Ricordi ,et al.** Evaluation of the Fully Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Pyrazinamide, Streptomycin, Isoniazid, Rifampin, and Ethambutol and Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method. *J CLINICAL MICROBIOLOGY*, Mar. **2004**, p. 1109–1114.
11. **Sanguinetti M, Posteraro B, Ardito F,** et al. Routine use of PCR-reverse cross-blot hybridization assay for rapid identification of *Mycobacterium* species growing in liquid media. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 1530-3.
12. <http://www.nationaljewish.org/healthinfo/conditions/ntm/history> 08.12.2014.
13. **Griffith DE.** Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Opin Infect Dis* **2010**; **23**:185-190.
14. **Iseman MD, Marras TK.** The importance of nontuberculous mycobacterial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**; 178:999-1000.

16. **Köksal F, Yaman A.** Farklı Bir Bakteri Topluluğu: Tüberküloz Basilleri Topluluğu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 11 - 12 Haziran 2003, Samsun
17. **Çakır S.** Tüberküloz Plöreziye Serum Ve Plevral Sıvı Örneklerinde Early Secreted Antigenic Target- 6 (Esat-6) ve Culture Filtrate Protein- 10 (Cfp-10) Antijenlerine Spesifik T- Lenfositleri Analizinin Tanısal Değeri. Doktora Tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, 2009.
18. **Bozkurt H.** Çok İlaç Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kökenlerinde Artmış İlaç Direncinin Tespiti. Uzmanlık tezi, İzmir, 2009.
19. **Bilgehan H.** Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. Basım, Bornova İzmir: Meta Basım, 2009.
20. **Kocabaş A.** Mikobakterilerin Yapısal ve Antijenik özellikleri. In: Kocabaş A, ed. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Adana: Emel Matbaası, 1991; 47-55.
21. **Yakıcı G.** Çoklu İlaç Dirençli (ÇİD) *Mycobacterium Tuberculosis* İzolatlarının Filogenetik İlişkilendirilmesinde Kullanılan IS6110, MIRUVNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Of Tandem Repeat), Spoligotyping Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2013.
22. **Gençaslan FS.** Kliniğimizde Son Altı Yılda İzlenen Ekstrapulmoner Tüberküloz Olgularının Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 2007.
23. **Grosset JH.** Bacteriology of Tuberculosis. In: Reichman LB, Hershfield ES, eds. Tuberculosis. A Comprehensive International Approach. New York: Marcel Dekker Inc, 1989; 49-73.
24. **Jarlier V, Nikaido H.** Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol* 1990; 172:1418-23.
25. **Jakko van I, Zeaur R, Arnout M, Martin JB, Roxane S, Roland B, and Dick van S.** Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis Complex* Subspecies. Centers For Disease Control and Prevention, Volume 18, Number 4-April 2012.
26. **Aydın Fe, Ülger M, Emekdaş G, Aslan G, Günal S.** Mersin İlinde Çiğ Sütlerden *Mycobacterium bovis* ve Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(2): 283-289.
27. **Slany M, Jezek P, Fiserova V, Bodnarova M, Stork J, Havelkova M** et al. *Mycobacterium marinum* infections in humans and tracing of its possible environmental sources. *Can J Microbiol* 2012;58(1):39-44.
28. **Johnston JM, Izumi AK.** Cutaneous *Mycobacterium marinum* infection ("swimming pool granuloma"). *Clin Dermatol* 1987;5(3):68-75.
29. **Streit M, Böhlen LM, Hunziker T, Zimmerli S, Tschanner GG, Nievergelt H** et al. Disseminated *Mycobacterium marinum* infection with extensive cutaneous eruption and bacteremia in an immunocompromised patient. *Eur J Dermatol* 2006; 16(1):79-83.
30. **Ang P, Rattana-Apiromikaj N, Goh CL.** Retrospective study of *Mycobacterium marinum* skin infections. *Int J Dermatol* 2000; 39(5):343-7

31. **Hofbauer G, Burg G, Nestle F.** Sporotrichoid infection with *Mycobacterium marinum*: successful therapy with oral tetracycline administration. *Hautarzt* **2000**; 51(5):349-52.
32. **Palenque E.** Skin disease and nontuberculous atypical mycobacteria. *Int J Dermatol* **2000**; 39(9):659-66.
33. **Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al.** Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**; 175(7):367-416.
34. **Razavi B, Cleveland MG.** Cutaneous infection due to *Mycobacterium kansasii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2000**; 38(3):173-5.
35. **Cross GM, Guill MA, Aton JK.** Cutaneous *Mycobacterium szulgai* infection. *Arch Dermatol* **1985**; 121(2):247-9.
36. **Hill CE, Soueid A, Srivastava S.** *Mycobacterium szulgai* tenosynovitis: a fishy tale. *Surg Infect (Larchmt)* **2012**; 13(1):67.
37. **Esteban J, García-Pedrazuela M, Muñoz-Egea MC, Alcaide F.** Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. *Expert Opin Pharmacother* **2012**; 13(7):967-86.
38. **Babalik A, Kuyucu T, Ordu EN, Ernam D, Partal M, Köksalan K.** Non-tuberculous mycobacteria infection: 75 cases. *Tuberk Toraks* **2012**; 60(1):20-31.
39. **Wolff K, Tappeiner G.** Mycobacterial diseases: Tuberculosis and atypical mycobacterial infections. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, editors. *Dermatology in General Medicine*. Vol 2. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Book Company, **1987**; p.2152-80.
40. **O'Brien DP, McDonald A, Callan P, Robson M, Friedman ND, Hughes A et al.** Successful outcomes with oral fluoroquinolones combined with rifampicin in the treatment of *Mycobacterium ulcerans*: an observational cohort study. *Negl Trop Dis* **2012**; 6(1):1473.
41. **Schwabacher H.** A strain of mycobacterium isolated from skin lesions of a cold-blooded animal, *Xenopus laevis*, and its relation to atypical acid-fast bacilli occurring in man. *J Hyg (Lond)* **1959**; 57(2):57-67.
42. **Torkko P, Suomalainen S, Livanainen E, Suutari M, Tortoli E, Paulin L, et al.** *Mycobacterium xenopi* and related organisms isolated from stream waters in Finland and description of *Mycobacterium botniense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **2000**; 50(3):283-9.
43. **Portaels F.** Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin Dermatol* **1995**; 13(3):207-22.
44. **Woods GL, Washington JA II.** Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: Review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis* **1987**; 9(2):275-94.
45. **Good RC, Snider DE.** Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States, 1980. *J Infect Dis* **1982**; 146(6):829-33.
46. **Gengoux P, Portaels F, Lachapelle JM, Minnikin DE, Tennstedt D, Tamigneau P.** Skin granulomas due to *Mycobacterium gordonae*. *Int J Dermatol* **1987**; 26(3):181-4.
47. **Shelley WB, Folkens AT.** *Mycobacterium gordonae* infection of the hand. *Arch Dermatol* **1984**; 120(5):1064-5.

48. **Davis BR, Brumbach J, Sanders WJ, Wolinsky E.** Skin lesions caused by *Mycobacterium haemophilum*. *Ann Intern Med* **1982**;97(5):723–4.
49. **Fonseca E, Alzate C, Cañedo T, Contreras F.** Nodular lesions in disseminated *Mycobacterium fortuitum* infection. *Arch Dermatol* **1987**;123(2):1603–4.
50. **Miller AC, Commens CA, Jaworski R, Packham D.** The turtle’s revenge: A case of soft-tissue *Mycobacterium chelonae* infection. *Med J Aust* **1990**;153(3):493–5.
51. **Wallace RJ Jr, Nash DR, Tsukamura M, Blacklock ZM, Silcox VA.** Human disease due to *Mycobacterium smegmatis*. *J Infect Dis* **1988**;158(1):52–9.
52. **Rappaport W, Dunington G, Norton L, Ladin D, Peterson E, Ballard J.** The surgical management of atypical mycobacterial soft-tissue infections. *Surgery* **1990**;108(2):36–9.
53. **Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL, et al.** Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA* **2009**;106:16393-16399.
54. **Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al.** An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**;175:367-416.
55. **Kim RD, Greenberg DE, Ehrmantraut ME, et al.** Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease: prospective study of a distinct preexisting syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**;178:1066–1074.
56. **Winthrop KL, Chang E, Yamashita S, et al.** Nontuberculous mycobacteria infections and antitumor necrosis factor-alpha therapy. *Emerg Infect Dis* **2009**;15:1556- 1561.
57. **Thomson RM, Yew WW.** When and how to treat pulmonary non-tuberculous mycobacterial diseases. *Respirology* **2009**; 14:12-26.
58. **Kobashi Y, Fukuda M, Yoshida K, et al.** Four cases of pulmonary *Mycobacterium avium intracellulare complex* presenting as a solitary pulmonary nodule and a review of other cases in Japan. *Respirology* **2006**;11:317-321.
59. **Khoor A, Leslie K, Tazelaar H, Helmers R, Colby T.** Diffuse pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria in immunocompetent people (hot tub lung). *Am J Clin Pathol* **2001**;115:755-762.
60. **Nash KA, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr.** Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother* **2005**; 55:170-177.
61. **Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr.** A novel gene, erm (41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:1367-1376.
62. **Wolinsky E.** Nontuberculous mycobacteria and associated disease. *Am Rev Respir Dis* **1979**; 119:107-59.

63. **Chow SP, Ip FK, Iau JHK, Collins RJ, Luk KDK, SoYC, et al.** *Mycobacterium marinum* infection of the hand and wrist. Results of conservative treatment in twenty-four cases. *J Bone Joint Surg* **1987**; *69-A*: 1161-8.
64. **Wallace RJ, Tanvor D, Brennan PJ, Brown BA.** Clinical trial of clarithromycin for cutaneous (disseminated) infections due to *Mycobacterium chelonae*. *Ann Intern Med* **1993**; *119*: 482-6.
65. **Sivapalasingam S, Steigbigel NH:** Macrolides, clindamycin, and ketolides, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 7. baskı" kitabında s.427-48, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia (**2010**).
66. **Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR:** Macrolides, ketolides, and glycolcyclines: azithromycin, clarithromycin, telithromycin, tigecycline, *Infect Dis Clin North Am* **2009**; *23(4)*:997-1026.
67. **Guay DR, Gustavson LE, Devcich KJ, Zhang J, Cao G, Olson CA:** Pharmacokinetics and tolerability of extended-release clarithromycin, *Clin Ther* **2001**; *23(4)*:566-77.
68. **Yalçın AN: Makrolidler, "Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds):** Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, 1. baskı" kitabında s.377-86, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara (**2008**).
69. **Bradbury BJ, Pucci MJ.** Recent advances in bacterial topoisomerase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* **2008**; *8*: 574-81.
70. **Hooper DC, Strahilevitz J:** Quinolones, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases, 7 ed." kitabında s. 487-510, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia (**2010**).
71. **Rice LB, Bonomo RA:** Mechanisms of resistance to antibacterial agents, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds): Manual of Clinical Microbiology, 9 ed." kitabında s.1114-45, ASM Press, Washington (**2007**).
72. **Ruiz J:** Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection, *J Antimicrob Chemother* **2003**; *51(5)*:1109-17.
73. **Braback M, Riesbeck K, Forsgren A.** Susceptibilities of *Mycobacterium marinum* to gatifloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, linezolid, moxifloxacin, telithromycin and quinupristin-dalfopristin (synercid) compared to its susceptibilities to reference macrolides and quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; *46*: 1114-6.148
74. **Rawat M, Newton GL, Ko M, Martinez GJ, Fahey RC, Av-Gay Y.** Mycothiol-deficient *Mycobacterium smegmatis* mutants are hypersensitive to alkylating agents, free radicals and antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; *46* : 3348-55.
75. **Lu T, Zhao X, Li X, Drlica-Wagner A, Wang JY, Domagala J, et al.** Enhancement of fluoroquinolones activity by C-8 halogen and methoxy moieties: action against a gyrase resistant mutant of *Mycobacterium smegmatis* and a gyrase-topoisomerase IV double mutant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; *45* : 2703-9.
76. **Naomi F. Walker^{1,2,3}, et al.** Simon O Doxycycline and HIV Infection Suppress Tuberculosis-induced Matrix Metalloproteinases. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* **2012**; *10.1164/rccm.201110-1769OC*

77. **Çilli A.** Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 163- 170.
78. **Wallace, R. J., Jr., K. Wiss, M. B. Bushby, and D. C. Hollowell.** 1982. In vitro activity of trimethoprim and sulfamethoxazole against the nontuberculous mycobacteria. *Rev. Infect. Dis.* **4**:326–331.
79. **Van Ingen J, Boeree MJ, Dekhuijzen PN, et al.** Clinical relevance of *Mycobacterium simiae* in pulmonary samples. *Eur Respir J* **2008**;31:106-109.
80. **Park S, Suh GY, Chung MP, et al.** Clinical significance of *Mycobacterium fortuitum* isolated from respiratory specimens. *Respir Med* **2008**;102:437-442.
81. **Jun HJ, Jeon K, Um SW, et al.** Nontuberculous mycobacteria isolated during the treatment of pulmonary tuberculosis. *Respir Med* **2009**;103:1936-1940.
82. **Jeong Y, Lee K, Koh W, et al.** Nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in immunocompetent patients: comparison of thin section CT and histopathologic findings. *Radiology* **2004**;231:880-886.
83. **Fujita J, Ohtsuki Y, Suemitsu I, et al.** Pathological and radiological changes in resected lung specimens in *Mycobacterium avium-intracellulare complex* disease. *Eur Respir J* **1999**;13:535-540.
84. **Reich J, Johnson R.** *Mycobacterium avium complex* pulmonary disease presenting as an isolated lingular or middle lobe pattern: The LadyWindermere syndrome. *Chest* **1992**;101:1605-1609.
85. **Obayashi Y, Fujii N, Suemitsu I, et al.** Successive follow-up of chest computed tomography in patients with *Mycobacterium avium-intracellulare complex*. *Respir Med* **1999**;93:11-15.
86. **Kwon Y, Koh W.** *Mycobacterium abscessus* pulmonary infection presenting as a solitary pulmonary nodule. *Intern Med* **2006**;45:169-171.
87. **Abe C, Hirano K, Tomiyama T.** Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis complex* by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* **1999**; 37(11): 3693-7.
88. **Marzouk M, Kahla IB, Hannachi N, et al.** Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis complex* in clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2011**; 69(4): 396-9.

89. **Simone G, Senna, Battilana J, Costa J, Silva M, Duarte R, Fonseca L, Suffys P, Bogo M.** Sequencing of *hsp65* Gene for Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Environmental and Clinical Sources in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* **2008**; 46: 3822–3825.
90. **Sharma B, Pal N, Malhotra B, Vyas L.** Evaluation of a Rapid Differentiation Test for *Mycobacterium Tuberculosis* from other Mycobacteria by Selective Inhibition with p-nitrobenzoic Acid using MGIT 960. *Journal of Laboratory Physicians* **2010**; 2(2):89-92.
91. **Pérez-Osorio A, Boyle D, Ingham Z, Ostash A, Gautom R, Colombel C, Houze Y, Leader B.** Rapid Identification of Mycobacteria and Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Use of a Single Multiplex PCR and DNA Sequencing. *J Clin Microbiol* **2012**; 50(2): 326-336.
92. **Günaydin M, Yanik K, Sanic A, Ceyhan I, Erturan Z, Durmaz R.** Distribution of Nontuberculous Mycobacteria strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **2013**; 12: 33.
93. **Kılıçaslan Z, Kuyucu T, Babalık A, Özkan G, Bingöl ZK, Ordu EN, et al.** Akciğerde Tüberküloz Dışı Mikobakteri Hastalığı: 42 Vakanın Retrospektif Analizi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* **2013**; 33(3):854-67.
94. **Albayrak N, Şimşek H, Sezen F, Arslantürk A, Tarhan G, Ceyhan İ, et al.** Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında 2009-2010 Yıllarında Tespit Edilen Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Dağılımlarının İrdelenmesi. *Mikrobiyol Bul* **2012**; 46(4):560-567.
95. **(Richter E, Niemann S, Gloeckner FO, Pfyffer GE and Rüsç-Gerdes S. *Mycobacterium holsaticum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2002; 52: 1991–1996..... Schinsky MF, Morey RE, Steigerwalt AG, Douglas MP, Wilson RW, Floyd MM et al. Taxonomic variation in the Mycobacterium fortuitum third biovariant complex: description of Mycobacterium boenickei sp. nov., Mycobacterium houstonense sp. nov., Mycobacterium neworleansense sp. nov. and Mycobacterium brisbanense sp. nov. and recognition of Mycobacterium porcinum from human clinical isolates. Int J Syst Evol Microbiol 2004; 54(pt5):1653-1667.)**
96. **(Leao SC, Tortoli E, Euzéby JP, Garcia MJ.** Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **2011**; 61(Pt9):2311-3.)
97. **Roux A, Catherinot E, Ripoll F, Soismier N, Macheras E, Ravilly S, Bellis G, Vibet M, Roux E, Lemonnier L, Gutierrez C, Vincent V, Fauroux B, Rottman M, Guillemot D, Gaillard J, Jean-Louis Herrmann for the OMA Group.** Multicenter Study of Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria in Patients with Cystic Fibrosis in France. *J Clin Microbiol* **2009**; 47: 4124–4128.
98. **Piersimoni C, Scarparo C.** Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis.* **2008**;8: 323–34.

99. **Baghaei P, Tabarsi P, Farnia P, Marjani M, Sheikholeslami FM, Chitsaz M, et al.** Pulmonary disease caused by *Mycobacterium simiae* in Iran's national referral center for tuberculosis. *J Infect Dev Ctries* **2012**; 6(1):23-28.
100. **Balkis MM, Mireille MK, Araj GF, Kanj SS.** Fatal disseminated *Mycobacterium simiae* infection in a non-HIV patient. *International Journal of Infectious Diseases* **2009**; 13:286-287.
101. **Jarand J, Levin A, Zhang L, Huitt G, Mitchell JD, Daley CL.** Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* Pulmonary Disease, *Clinical Infectious Diseases* **2011**; 52(5):565–571.
102. **Nessar R, Cambau E, Reyrat JM, Murray A and Gicquel B.** *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67(4):810-8.)

ÖZGEÇMİŞ

Farhad KOHANSAL KOSHK SARAY 26.07.1988 tarihinde Tebriz İnan'da doğdu. Özel Mohamad Bager Lisesini, 2007'de bitirmiş olup İslami Azad Üniversitesi Laboratuvar Bilimleri Veteriner Bölümün'den 2011 yılında mezun oldu. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.