

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**HIZLI ÜREYEN MİKOBAKTERİLERİN
ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

DR. MÜGE HACER ÖZKARATAŞ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR - 2020

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**HIZLI ÜREYEN MİKROBAKTERİLERİN
ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MÜGE HACER ÖZKARATAŞ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. AYŞE AYDAN ÖZKÜTÜK

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2019.KB.SAG.030
sayı ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜRLER

Asistanlığım boyunca ve tezimin tamamlanması için geçen süreçte bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteğini ve çabasını benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK'e, eğitimime katkılarından dolayı başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nuran ESEN olmak üzere tüm değerli hocalarıma, aynı çalışma ortamını paylaşmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, bu süreci beraber geçirdiğim merkez laboratuvarı ve anabilim dalındaki çalışma arkadaşlarıma, yardımları, dostlukları ve bilgi paylaşımlarından dolayı Araş. Gör. Nazlı ARSLAN, Biyolog Feryal UYSAL ve Macide OYLUM'a çok teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen başta annem Necla ORHAN ve babam Muzaffer ORHAN olmak üzere sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Yorucu ve uzun süren çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen sevgili eşim Emre ÖZKARATAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Müge Hacer ÖZKARATAŞ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	I
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
TABLO LİSTESİ.....	IV
KISALTMALAR.....	V
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. Terminoloji.....	7
4.2. Tarihçe.....	7
4.3. TDM'lerin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	9
4.3.1. Genel Özellikler ve Hücre Duvar Yapısı.....	9
4.3.2. Üreme Özellikleri.....	12
4.4. TDM'lerin Sınıflandırılması.....	12
4.5. TDM'ler ve Çevre İlişkisi.....	14
4.6. TDM'lerin Epidemiyolojisi.....	15
4.7. TDM'lerde Patogenez ve Virülans Özellikleri.....	18
4.8. TDM'lerin Tanısı.....	20
4.8.1. TDM'lerde Klinik Tanı Kriterleri.....	20
4.8.2. TDM'lerde Mikrobiyolojik Tanı.....	21
4.8.2.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi.....	22
4.8.2.2. Mikroskopik Değerlendirme.....	23
4.8.2.3. Kültür Yöntemleri.....	25
4.8.2.4. TDM'lerin Tanımlanması.....	28

4.8.2.4.1. Fenotipik Yöntemler.....	29
4.8.2.4.2 İmmünokromotografik Yöntem.....	32
4.8.2.4.3. Moleküler Yöntemler.....	32
4.8.2.5. HÜM Türlerinin Tanımlanması.....	32
4.8.2.5.1. Biyokimyasal Yöntemler.....	32
4.8.2.5.2. HPLC.....	33
4.8.2.5.3. Moleküler Yöntemler.....	33
4.8.2.5.4. MALDI-TOF MS.....	35
4.8.2.6. HÜM'lerde Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	35
4.9. HÜM Türleri ve Özellikleri.....	36
4.10. HÜM'lerde Test Edilecek Öncelikli Antibiyotikler.....	37
4.10.1. Amikasin	38
4.10.2. Sefoksitin.....	38
4.10.3. Siprofloksasin.....	38
4.10.4. Klaritromisin	38
4.10.5. Doksisisiklin	39
4.10.6. Minosiklin.....	39
4.10.7. İmipenem	39
4.10.8. Linezolid.....	40
4.10.9. Moksifloksasin.....	40
4.10.10. Trimetoprim-Sulfametoksazol.....	40
4.10.11. Tobramisin.....	40
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
5.1. Çalışmaya Alınan HÜM Suşları.....	41
5.2. HÜM'lerin Üretilmesi.....	41

5.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi.....	41
6. BULGULAR.....	48
7. TARTIŞMA.....	52
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
9. KAYNAKLAR.....	65
10. EKLER.....	78
Ek 1. Etik Kurul Onayı.....	78



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mikobakterilerin Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama görüntüsü.....	10
Şekil 2. Mikobakteri hücre duvarı.....	11
Şekil 3. Sıvı mikrodilüsyon plağının üstten görünümü.....	45
Şekil 4. Sıvı mikrodilüsyon plağının alttan görünümü.....	45

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. TDM’lerde Runyon Sınıflaması.....	13
Tablo 2. Woods ve Washington Sınıflama Şeması.....	14
Tablo 3. TDM akciğer hastalığı tanısında klinik ve mikrobiyolojik kriterler.....	21
Tablo 4. Karbol fuksin ve florokrom yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi ve sonuçların bildirilmesi.....	24
Tablo 5. Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal özellikler.....	31
Tablo 6. HÜM’ler test edildiğinde <i>S. aureus</i> ATCC® 29213, <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 ve <i>E. faecalis</i> ATCC® 29212 için MİK değerlerinin (µg/mL) kalite kontrol aralıkları.....	46
Tablo 7. HÜM’ler için sıvı mikrodilüsyon değerlendirme kriterleri.....	47
Tablo 8. İzolatların örnek grubu ve türlere göre dağılımı.....	48
Tablo 9. HÜM izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.....	50
Tablo 10. HÜM izolatlarının çalışılan antimikrobiyaller için saptanan MİK değerleri.....	51

KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ADT: Antimikrobiyal duyarlılık testi

AIDS: Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu – ‘*Acquired Immune Deficiency Syndrome*’

ARB: Aside dirençli bakteri

AS: Ek türler – ‘*Additional species*’

ATCC: Amerikan tipi kültür koleksiyonu – ‘*American Type Culture Collection*’

ATS: Amerikan Toraks Derneği – ‘*American Thoracic Society*’

BCG: *Bacille Calmette-Guerin*

CLSI: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü – ‘*Clinical and Laboratory Standards Institute*’

CM: Sık görülen mikobakteriler – ‘*Common mycobacteria*’

EZN: Ehrlich-Ziehl-Neelsen

GU: Üreme indeksi – ‘*growth unit*’

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Tanımlama – ‘*High performance liquid chromatographic identification*’

HÜM: Hızlı üreyen mikobakteri

IDSA: Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği – ‘*Infectious Diseases Society of America*’

INH: İsoniazid

KAMHB: Katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyeri

KF: Kistik fibrozis

LAM: Lipoarabinomannan

LJ: Löwenstein-Jensen

LPA: Ters hibridizasyon testleri – ‘*Line Probe Assay*’

MAK: *Mycobacterium avium* kompleks

MALDI-TOF MS: Matriks-Destekli Lazer Deiyonizasyon – Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi - ‘*Matrix-assisted Laser Deionization–Time of Flight Mass Spectrometry*’

MGIT: *Mycobacteria growth indicator tube*

MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon

MOTT: *M. tuberculosis* dışı mikobakteriler – ‘*Mycobacteria other than tuberculosis*’

MTK: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

NALC: N-Asetil-L-Sistein

NaOH: Sodyum hidroksit

NTM: Non-tüberküloz mikobakteriler

OT: *Old tuberculin*

PBP: Penisilin bağlayan protein

PRA: Restriksiyon enzim analizi yöntemi

PZT: Polimeraz zincir tepkimesi

RGM: *Rapidly growing mycobacteria*

TB: Tüberküloz

TDM: Tüberküloz dışı mikobakteri

T2H: Tiofen-2 karboksilik asit hidrazid

ÖZET

Hızlı Üreyen Mikobakterilerin Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çevrede yaygın olarak bulunan hızlı üreyen mikobakterilere (HÜM) bağlı enfeksiyonlar, hem immün sistemi baskılanmış hem de immün sistemi sağlam olan hastaları etkileyebildiğinden klinik öneme sahiptir. HÜM'e bağlı enfeksiyonların tedavisi; birinci basamak antitüberküloz ajanların birçoğuna dirençli olmaları, uzun süreli çoklu ilaç rejimi gerektirmesi, maliyetli oluşu ve ilaca bağlı toksisiteler nedeniyle zordur. Bu çalışma ile Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus* ve *Mycobacterium chelonae* izolatlarının in-vitro antimikrobiyal duyarlılık profillerinin araştırılması ve epidemiyolojik verilerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2013-2018 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen 35 *M. fortuitum*, 19 *M. abscessus* ve dört *M. chelonae* izolatu Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerlerine pasajlanarak üretildi ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile amikasin, sefoksitin, siprofloksasin, klaritromisin, doksisisiklin, imipenem, linezolid, moksifloksasin ve tobramisin için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü – ‘*Clinical and Laboratory Standards Institute*’ (CLSI) önerilerine uygun olarak in-vitro antimikrobiyal duyarlılık profilleri belirlendi.

M. abscessus izolatlarının %73.68'i (14/19) amikasine duyarlı bulundu; klaritromisine duyarlılıkları ise sırasıyla üçüncü günde %73.68 (14/19), 14. günde %21.05 (4/19) olarak saptandı. İzolatların tümü imipeneme duyarlıydı.

M. fortuitum izolatlarının klaritromisine duyarlılık oranları; üçüncü gün %32.35 (11/34) iken 14. günde %2.94 (1/34) olarak belirlendi. İzolatların tümü (n=35) amikasin, siprofloksasin ve moksifloksasine duyarlı olarak saptandı. *M. fortuitum* izolatlarının hiçbirinde sefoksitin ve imipeneme direnç gözlenmedi.

M. chelonae izolatlarının tümü (n=4) amikasin, tobramisin ve klaritromisine duyarlı bulundu. Sefoksitine duyarlı *M. chelonae* izolatu görülmedi. Tüm sonuçları toplu olarak değerlendirdiğimizde izolatların en duyarlı olduğu antimikrobiyal ajan amikasin iken en dirençli olduğu ajan doksisisiklin olarak belirlendi.

Sonuç olarak çalışmamız antimikrobiyal duyarlılık durumunun türler arasında farklılık gösterdiğini desteklemiş ve aynı zamanda hastanelerin kendi bölgelerindeki izolatların duyarlılık paternlerini bilmesinin ne kadar önemli olduğunu da göstermiştir. şüphesiz hızlı üreyen mikobakterilerin kullanılan antimikrobiyallere duyarlılık durumlarını bilmek kadar doğru tür tayininin de tedavide kritik olduğunu unutmamak gerekir.

Anahtar kelimeler: Hızlı üreyen mikobakteri, Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, Antimikrobiyal duyarlılık



SUMMARY

Evaluation of Antimicrobial Susceptibilities of Rapidly Growing Mycobacteria

Infections related to the rapidly growing mycobacteria (RGM), which are common in the environment, have clinical significance as they can affect both immunocompromised and immunocompetent patients. Treatment of RGM related infections is difficult, because they are resistant to many of the first-line tuberculosis agents, drug therapy typically involves a long-term multiple drug regimen, which is costly, and is associated with drug-related toxicities. The aim of this study was to investigate the in-vitro antimicrobial susceptibility profiles of *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae* isolates isolated in Dokuz Eylül University Hospital and to reveal epidemiological data.

Total of 58 isolates included (35 *M. fortuitum*, 19 *M. abscessus* and four *M. chelonae*), which were isolated in Dokuz Eylül University Hospital between 2013 and 2018, were subjected to in vitro testing for nine antimicrobial agents (amikacin, cefoxitin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, imipenem, linezolid, moxifloxacin and tobramycin) with the broth microdilution method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

For *M. abscessus*; 73.68% (14/19) of the isolates were found susceptible to amikacin; %73.68 (14/19) of isolates were susceptible to clarithromycin the third day and only 21.05% (4/19) of them remained susceptible at day 14. No resistance to imipenem were observed in *M. abscessus* isolates.

For *M. fortuitum* clarithromycin susceptibility decreased from %32.35 (11/34) to %2.94 (1/34) after an additional incubation until 14 days. All tested isolates of the *M. fortuitum* (n=35) were susceptible to amikacin, ciprofloxacin and moxifloxacin. None of the *M. fortuitum* isolates exhibited resistance to cefoxitin and imipenem.

Antibiotic susceptibility testing of the four *M. chelonae* isolates demonstrated 100% susceptibility for amikacin, clarithromycin and tobramycin; none of the isolates were susceptible to cefoxitin. Both *M. fortuitum*, *M. abscessus* and *M. chelonae* isolates were highly susceptible to amikacin; and were highly resistance to doxycycline.

In conclusion, our study supported that status of antimicrobial susceptibilities were

different between species and also showed that the importance for hospitals to know susceptibility patterns of isolates in their region. It should be noted that accurate species determination is critical for treatment as well as susceptibility status of rapidly growing mycobacteria to the antimicrobials in use.

Keywords: Rapidly growing mycobacteria, Broth microdilution method, Antimicrobial susceptibility



3. GİRİŞ VE AMAÇ

Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTK) ve *Mycobacterium leprae* dışındaki mikobakteri türleri, tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) veya atipik mikobakteriler olarak adlandırılırlar (1). TDM'ler 170'den fazla farklı türü içermekte ve tür dağılımı coğrafi farklılıklar göstermektedir (1, 2).

Geçmişte hastalık etkeni olarak değerlendirilmeyen TDM'lerin, günümüzde bağışıklık sistemini baskılayan hastalık ve tedavilerin artmasına bağlı olarak giderek artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak izole edildiği görülmektedir (3, 4).

Endüstrileşmiş pek çok ülkede TDM'ye bağlı hastalıklar görülmektedir; insidans oranları yüz binde 1-1.8 arasında değişmektedir. Bu genel insidans oranları, rapor edilen TDM izolatlarının sayısına dayalı tahminlerdir (2). TDM'ler ülkemizde ve dünyada bildiri zorunlu hastalıklar grubunda yer almadığı ve her kurumda tanımlaması yapılmadığı için TDM yaygınlığı ile ilgili bilgi vermek zordur.

1959'da Ernest Runyon TDM'ler için ilk sınıflama sistemini önermiştir. Bu sınıflamada TDM'leri üreme hızları, koloni morfolojileri ve pigment üretimlerine göre fotokromojenler, skotokromojenler, kromojen olmayanlar ve hızlı üreyenler olarak dört gruba ayırmıştır (5).

HÜM; *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* ve çeşitli nadir türler de dahil olmak üzere çok sayıda farklı tür içerir (6).

TDM'ler arasındaki HÜM oranı 1992 ile 1996 yılları arasında %14 iken 2001'de %35'e yükselmiş ve iki kattan fazla bir artış göstermiştir (7).

HÜM'ler, sağlık hizmetleri ile ilişkili bir dizi salgın ve yalancı salgınlardan sorumlu olmuştur (8). Kronik akciğer enfeksiyonları, cilt/yumuşak dokular ve iskelet enfeksiyonları, kateter enfeksiyonları ve yaygın enfeksiyonları içeren HÜM'e bağlı enfeksiyonlar, son yıllarda hem immün sistemi baskılanmış hem de immün sistemi sağlam olan hastaları etkileyebildiğinden klinik öneme sahiptir. HÜM'e bağlı enfeksiyonların tedavisi birinci basamak antitüberküloz ajanların bir çoğuna dirençli olmaları nedeniyle güçtür (9). Ciddi HÜM enfeksiyonlarının tedavisi zordur; ilaç tedavisi tipik olarak uzun süreli çoklu ilaç rejimini içerir, maliyetlidir ve ilaca bağlı toksisiteler ile ilişkilidir (10).

Antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin HÜM türleri arasında açık bir şekilde farklı

olduğu ve HÜM türlerinin (ve hatta alt türlerin) ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin (ADT) doğru tanımlanmasının, HÜM enfeksiyonlarının tedavisi için önemli olduğu gösterilmiştir (11). HÜM duyarlılık testi, optimal etkili ilaç tedavisini seçmek ve uzun süreli tedavi ile ortaya çıkabilen mutasyona bağlı ilaç direncinin gelişimini izlemek için gereklidir (8). HÜM enfeksiyonları için antimikrobiyal tedavinin seçimi temel olarak in-vitro ADT'ye dayanır ve bu da ilgili HÜM türüne göre değişmektedir (2).

Aralık 2000'de Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (National Committee for Clinical Laboratory) üyeleri Antimikrobiyal Duyarlılık - Mikobakteri Alt Komitesi, HÜM duyarlılık testi için "altın standart" olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri saptanmasını önermiştir (8).

HÜM'lere karşı amikasin, sefoksitin, siprofloksasin, klaritromisin, doksisisiklin (veya minosiklin), imipenem, linezolid, moksifloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol ve tobramisin test edilmesi önerilen ajanlar arasında yer almaktadır (12).

Bununla birlikte, bugüne kadar HÜM enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve antimikrobiyal duyarlılık durumu ile ilgili yayınlanmış raporlar esas olarak Türkiye dışındaki ülkelerden elde edilmiştir ve bu çevresel bakteriler grubunun dağılımındaki olası coğrafi çeşitlilik, küresel verilerin yerel bağlamla doğrudan ilgili olmayabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma ile Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde 2013-2018 yılları arasında izole edilen 35 adet *M. fortuitum*, 19 adet *M. abscessus* ve dört adet *M. chelonae* izolatının CLSI tarafından önerilen antibiyotiklerden amikasin, sefoksitin, siprofloksasin, klaritromisin, doksisisiklin, imipenem, linezolid, moksifloksasin ve tobramisin için in-vitro antimikrobiyal duyarlılık profillerinin araştırması ve epidemiyolojik verilerin ortaya koyulması amaçlanmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Terminoloji

Actinomycetales takımı, *Mycobacteriaceae* ailesindeki tek cins olan *Mycobacterium* cinsinin hareketsiz olması, basilin morfolojisi (hafif kavisli ve çubuk şeklinde) ve karbol fuksin ile boyanmasının ardından asit-alkolle dekolorizasyona tipik olarak dirençli olması tanımlamada temel özelliklerini oluşturmaktadır (13).

Mycobacterium türlerinin DNA'sındaki yüksek Guanin+Sitozin içeriği (*M. leprae* dışında %61-71 mol), diğer mikolik asit içeren *Tsukamurella*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* cinsleri ile benzerlik göstermektedir (14).

1935 yılında Pinner, *M. tuberculosis* ve *M. leprae* suşlarına benzemeyen mikobakteri türleri için hayvanlardaki virülans, koloni morfolojisi ve besiyerinde pigment karakteristiklerine göre "atipik aside dirençli mikroorganizmalar" terimini geliştirmiştir (15).

Timpe ve Runyon da tıpkı Pinner gibi tipik insan tüberküloz basiline benzemeyen klinik izolatlar için 'atipik' terimini dile getirmişlerdir. Tüm mikobakterileri değerlendirmede, *M. tuberculosis*'i merkezde tutma temelli yaklaşım, mikobakteri taksonomi sisteminde düzenli gelişimin önüne geçmiştir. *M. tuberculosis* temelli hayvan virülans testlerinden ziyade *Mycobacterium* cinsine yönelik genel yaklaşım benimsedikçe taksonomi gelişmiş ve atipik olarak tabir edilen türlerin her birinin kendi türüne özgü özelliklere sahip türler olduğu ortaya çıkmıştır.

"Mycobacteria other than tubercle bacilli" veya "nontuberculous" mikobakteri gibi geniş spektrumlu adlandırmalar kullanılmıştır. *M. tuberculosis* dışında insan ve hayvan hastalıklarına sebep olan diğer mikobakterilerin çoğunun insandan insana bulaşının ender olması, doğada bulunması ve fırsatçı olmaları sebebiyle Wayne ve Sramek 1992 yılında "Potansiyel Patojen Çevresel Mikobakteri" tanımlamasını yapmışlardır (15). Günümüzde, MTK dışındaki mikobakteriler için tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM), non-tüberküloz mikobakteriler (NTM), *M. tuberculosis* dışı mikobakteriler – '*Mycobacteria other than tuberculosis*' (MOTT) veya atipik mikobakteriler tanımlamaları kullanılmaktadır (16).

4.2. Tarihçe

Tüberküloz (TB), tarih öncesi çağlardan günümüze dek insanlıkla iç içe seyretmiş bir enfeksiyon hastalığıdır. Mikobakterilerin kökeninin yaklaşık 150 milyon yıl öncesine

dayandığı sanılmaktadır (17). Kanıtları M.Ö. 8000 yıllarına uzanan insanlığın mikobakterilerle karşılaşmasında, toplu yaşama geçiş ve sığırların evcilleştirilmesi gibi faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir (18).

M.Ö 2400 yıllarında, Mısır mumyalarında pott lezyonları ve benzeri anormallikler gibi TB için tipik iskelet anormallikleri resmedilmiş, sırasıyla Hindistan ve Çin’de, M.Ö. 3300 ve 2300’lü yıllarda TB’yi tarif eden ilk yazılı belgeler bulunmuştur (19).

TB basilinin yaptığı hastalık geçmişte farklı şekillerde adlandırılmıştır. Romalılar tarafından ‘Fitizis’ (balgamlı öksürük ve hırıltılı solunum) olarak tanımlanan TB’den ‘Beyaz Ölüm’, ‘Beyaz Veba’, ‘Ölümün Kaptanı’, ülkemizde ise sıklıkla ‘İnce Hastalık’ olarak bahsedilmektedir (20). Günümüz literatüründe kullanılan ‘tüberküloz’ kelimesi Latince olup ilk kez 19. yüzyılda Laennec ve Bayle tarafından kullanılmıştır (18).

Tüberküloz epidemilerinin asırlardır dalgalanmalarla seyrettiği belirtilmektedir. M.Ö. 1500-0 yılları arasında Nil Vadisi, 500-1500 yılları arasında Kuzey Amerika ve 1000-2000 seneleri arasında da Avrupa’da epidemilere neden olmuştur. Bu salgınların ortaya çıkışında hastalığın doğal seyri ve immün sistem kadar global nüfus artışı, göç akımları, sosyo-ekonomik şartlar ve sanayi devrimi de büyük rol oynamıştır (21).

On dokuzuncu yüzyılda, hastalığın enfeksiyöz doğasının anlaşılmasında önemli olan olaylar yaşanmıştır. A. Villemin 1865 yılında TB nedeniyle ölen bir hastanın kavitesinden alınan örneği tavşanlara inoküle ederek TB geliştiğini ortaya koymuştur (17, 19). Tıp tarihinde dönüm noktası olan 24 Mart 1882’de, Robert Koch (1843-1910) tüberkülozun nedenini bulduğunu Berlin Fizyoloji Derneği’nin aylık toplantısında duyurmuştur. Aynı yıl, bir organizmanın bir hastalığın nedeni olduğunu kanıtlamak için gerekli olduğunu belirttiği, günümüzde “Koch postülatı” olarak bilinen metodolojiyi ileri sürmüştür (22). Koch, 1890 yılında *M. tuberculosis* ekstresi olan ‘old tuberculin’i (OT) geliştirmiştir. Aslında tedavi amacıyla geliştirilen ancak başarısız olan tüberkülin, immünite üzerine yapılacak çalışmalar için temel oluşturmuş ve enfekte olan ile olmayan bireylerin ayırımında tanısal bir araç olarak yer almıştır (22).

1921 yılında Fransız araştırmacılar Albert Calmette ve Camille Guerin bir inekten elde ettikleri TB basilini yirmi yıl boyunca 230 kez pasajlayarak ‘*Bacille Calmette-Guerin*’ (BCG) adıyla bilinen ve bugün hala kullanılan aşığı geliştirmişlerdir (21).

1940'lı yıllarda Waksman'ın streptomisini keşfetmesi ile TB tedavisinde antibiyoterapi dönemi başlamış ancak mono-terapi nedeniyle kısa zamanda direnç sorunu ortaya çıkmıştır. 1946'da İsveç'te para-amino salisilik asidin basile etkili olduğunun gösterilmesi ve 1950'li yıllarda izoniazidin (INH) bulunmasıyla 18-24 ay süreyle üç ilacın uygulanması sonucunda TB tedavi edilebilir bir hastalığa dönüşmüştür. 1954 yılında pirazinamid, 1962 yılında etambutol, 1966 yılında rifampisin bulunarak tedavide altı aylık bir sürenin yeterli olabileceği belirlenmiştir (18).

TDM'ler ilk olarak 1950'li yıllarda geleneksel TB tedavisine yanıtız kalan ve altta yatan akciğer hastalığı olan hastalarda %1-2 oranında insan patojeni olarak tanımlanmışlardır (23). Günümüzde çeşitli derecelerde patojenite ve virülansa sahip 170'den fazla TDM, toprakta ayrıca su kaynaklarında bulunmaktadır (1, 14, 23). Gün geçtikçe tanımlanan TDM tür sayısının artması, yeni türlerin ortaya çıkmasından ziyade mikobakteri tür ayrımında moleküler laboratuvar tekniklerindeki ilerlemeyi yansıtmaktadır (24). İnsandan insana bulaştığına dair hiçbir kanıt bulunmayan TDM'ler hem immün süprese hem de sağlıklı insanlarda hastalık oluşturabilmekte, akciğer ve akciğer dışı çeşitli enfeksiyonlara yol açabilmektedir (25, 26).

Gelişmiş ülkelerde insan immün yetmezlik virüsü (HIV) prevalansındaki artış, TDM enfeksiyonlarının artışında büyük pay sahibidir. Bununla birlikte, bu bakterilerin insanda patojen olduğu bilgisi ve farkındalığın artması, laboratuvar yöntemlerindeki ilerlemeler ve insanların bu türlerle temaslarının artması da TDM'lere bağlı gelişen hastalık yükündeki belirgin artışa katkıda bulunmuştur (27).

4.3. TDM'lerin Mikrobiyolojik Özellikleri

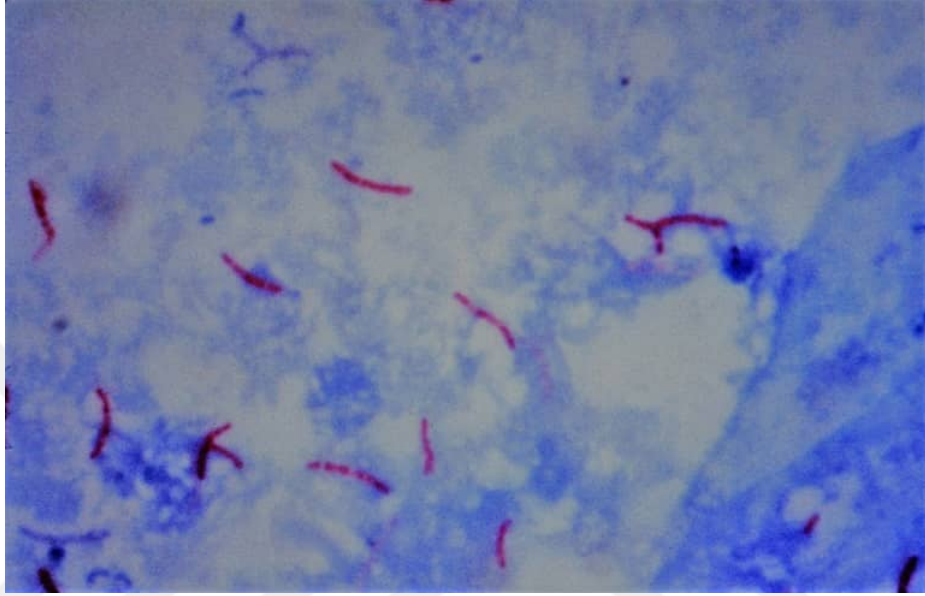
4.3.1. Genel Özellikler ve Hücre Duvar Yapısı

Mikobakteriler aerop, sporsuz (*Mycobacterium marinum* hariç), hareketsiz, 0.2-0.6 µm eninde ve 1-10 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık basillerdir (14).

Mikobakteri hücre duvar yapısı, gram negatif bakterilerde bulunan dış membranın bulunmamasından dolayı gram pozitif bakterilere benzerlik gösterse de protein ve polisakkaritten ziyade yoğun olarak lipitleri barındırdığı için iki gruba da uymamaktadır. Kristal viyoleyı koruyamadıkları için gram boyamada hayalet hücreler olarak gözlenirler. TB basilinin keşfinde, Robert Koch alkalın boyalarla özel boyama işlemi uygulamıştır.

Sonrasında, Ehrlich TB basilinin aside dirençlilik özelliğini ortaya koyarak patolojik örneklerde basilin tanımlanmasını oldukça kolaylaştırmıştır. Aside dirençlilik; mikroorganizmaların karbol fuksin gibi arilmetan boyalarla boyandıktan sonra asit-alkol ile renksizleşmeye dirençli olması şeklinde belirtilmektedir (28).

Şekil 1. Mikobakterilerin Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama görüntüsü (29).

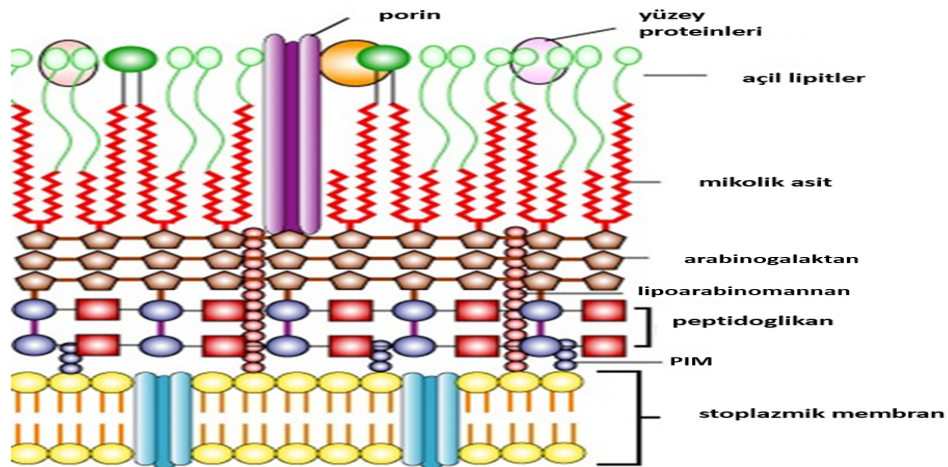


Mikobakteri hücre duvarı temelde üç yapısal bileşen içermektedir. Çift katlı fosfolipid yapıdaki plazma zarı üzerinde, iç tabakada peptidoglikan yer almaktadır. Peptidoglikan, temelde glikan omurga ve kısa peptid yan zincirleri içerir ve hücreye şeklini kazandırır, rijidite ve osmotik stabiliteyi sağlar. Mikobakteri peptidoglikanında farklı olarak, muramik asidin asetillenmiş formu yerine glikolik asitle glikozillenmiş formu bulunmakta ve tetrapeptid yan zincirlerde diaminopimelik asit yer almaktadır. Ortada yer alan arabinogalaktan tabaka ise peptidoglikan tabakaya fosfodiester bağı ile bağlıdır. Arabinogalaktanlara kovalent bağlarla bağlı olan mikolik asitlerle (70-90 karbonlu uzun zincirli α -alkil- β -hidroksi yağ asitleri) birlikte hücre duvarının temel iskeleti olan mikolikarabinogalaktan peptidoglikan oluşur. Bu iskeletin sağlamlığı, lipoarabinomannan (LAM), mannosfosfoinositid, serbest lipid ve polipeptidlerin de bulunmasıyla daha da artar (30-33). Mikobakteriyel hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturan mikolik asitler hücre yüzey geçirgenliğini büyük ölçüde etkileyen güçlü hidrofobik moleküllerdir. Hücre duvarının lipidden zengin olması, mikroskopik incelemede kullanılan birçok boyanın hücre içine penetrasyona engel olmakta ve basile 'aside dirençlilik' özelliğini

kazandırmaktadır (33, 34). Mikolik asit, trehaloz ile esterleşerek kord faktörünü oluşturmaktadır. MTK üyelerinin özellikle virulan suşları tarafından üretilen ve önemli bir virülans faktörü olan kord faktörü (Trehaloz 6,6' dimikolat), kültürde üreyen kolonilerden hazırlanan preparatlarda bakterilerin yılankavi kordonlar oluşturmalarına sebep olduğu gibi, polimorfonükleer lökosit migrasyonunun inhibisyonu ve granülom oluşumunu stimüle etme gibi çeşitli fonksiyonlara da sahiptir (34, 35). Çeşitli insan mikobakteri suşlarından ekstrakte edilen, yapısında doymamış yağ asidi (mikolik asit) esteri içeren peptidoglikolipid yapıda Wax-D, Freund-tipi adjuvan aktiviteye sahiptir (36). Bunların dışında fitiyoserol dimikoserozat, sülfolipidler, fosfotidilinozitol mannozidler gibi serbest lipidler de hücre duvarında yer almaktadır. Sülfolipidler, fagozom-lizozom füzyonunu önleyerek bakterinin hücre içinde canlılığının devamını sağlar ve virülansı artırır (37). Duvar yapısında yer alan gliko-konjuge lipitlerden LAM, plazma membranına bağlanarak hücre duvarı boyunca uzanmakta ve fagozomal maturasyonu inhibe ederek konak hücrede canlılığın devam etmesini sağlamaktadır (35, 38).

Hücre duvarının en dışında bulunan polipeptidler duvar ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. Hücre duvarında yer alan proteinlerin bazıları yapısal göreve sahiptir. Ayrıca porin olarak adlandırılan, mikolik asit tabakasından geçişe izin veren hidrofilik özellikte kanal görevi gören proteinler de bulunmaktadır. Robert Koch'un keşfettiği OT, tüberkülin deri testinde kullanılan ısıya dayanıklı antijenik özellikte bir proteindir. Purifiye protein derivesi, OT'nin saflaştırılmasıyla elde edilen, *M. tuberculosis* veya ürünleri ile karşılaşmayı değerlendirmede kullanılan protein derivesidir (28, 39).

Şekil 2. Mikobakteri hücre duvarı.



4.3.2. Üreme Özellikleri

Çoğu tür, azot kaynağı olarak amonyak veya amino asitler, karbon kaynağı olarak gliserol ve mineral tuzları gibi nispeten basit substratlarla büyümeye kolayca adapte olur. Mikobakterilerin üremesi %10-20'lik karbondioksit içeren ortamda ve yumurta sarısı veya oleik asit formuyla sağlanan yağ asitleri aracılığıyla artar. Oleik asit yüksek konsantrasyonlarda (\geq %1) toksik olup etkisinin albümin ile nötralizasyonu gerekmektedir. İdeal üreme sıcaklıkları ise türler arasında oldukça değişkenlik göstermektedir (<30°C ile 45°C arasında). Yavaş üreyen mikobakteriler arasında gruplanan türlerin çıplak gözle görülebilen matür koloniler oluşturması için yedi günden daha uzun süreye ihtiyaç duyulurken, HÜM türleri genellikle yedi gün içinde olgunlaşmaktadır. Üremeleri için katı ve sıvı besiyerleri birlikte kullanılmaktadır. TDM'ler, *M. tuberculosis* için kullanılan besiyerlerinde rahatlıkla ürerken bazı türler daha güç üremekte ve mikobaktin, hemin gibi ek maddelere ihtiyaç duymaktadır. Koloni morfolojileri türler arasında düzgün (*smooth* - S tipi) koloniden kaba (*rough* - R tipi) koloniye, pigmentsiz (fotokromojen olmayan) koloniden pigmentli koloniye değişkenlik gösterebilmektedir (14, 40, 41).

4.4. TDM'lerin Sınıflandırılması

Mycobacterium cinsinde başta MTK üyeleri, *M. leprae* ve *Mycobacterium ulcerans* olmak üzere birçok tür belirgin patojendir. Bunlara ek olarak, çeşitli derecelerde patojenite ve virülansa sahip, TDM olarak adlandırılan 170'den fazla çevresel mikobakteri türü vardır (1, 14).

TDM'ler; doğada yaygın bulunma, insandan insana bulaşma kanıtının olmaması, fakültatif patojen olma, insanlar için hastalık yapma potansiyellerinin değişken olması, patogenezin hala tanımlanamamış olması ve ilgili organizma ile hastalık bölgesine göre değişebilmekle birlikte tedavinin zor olması gibi bazı ortak özellikleri paylaşırlar (42, 43).

1950'lerin sonunda, *M. tuberculosis* dışındaki mikobakteri türleri ile tıbbi uygulamalarda artan sıklıkla karşılaşıldığından, Runyon, bu “atipik” organizmaları üreme hızı ve pigment üretimine dayalı olarak dört gruba ayırmıştır;

Grup I: Fotokromojen;

Grup II: Skotokromojen;

Grup III: Fotokromojen olmayanlar (Nonkromojen);

Grup IV: Hızlı üreyenler (5, 40, 41).

Tablo 1. TDM’lerde Runyon Sınıflaması.

Runyon Grup	Pigment (sarı-portakal rengi)	Koloni Morfolojisi	Üreme hızı	Türler
Grup I Fotokromojen	Karanlıkta renksiz, ışıkta pigmentli	Genellikle S	Yavaş	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. simiae</i>
Grup II Skotokromojen	Karanlıkta ve ışıkta pigmentli	Genellikle S	Yavaş	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. flavescens</i>
Grup III Nonkromojen	Karanlıkta ve ışıkta pigmentsiz	S	Yavaş	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. gastri</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i>
Grup IV Hızlı Üreyenler	Pigmentli veya pigmentsiz	Genellikle S	Hızlı	<i>M. peregrinum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. simematis</i> <i>M. vaccae</i>

Daha önceden bilinen ve yeni keşfedilen mikobakteri türlerinin genetik, hücre yapısı ve anormal fenotipik özellikleri konusundaki gelişmeler, bilgimizi klasik Runyon sınıflandırma sisteminin ötesine taşımıştır (40, 41).

Mycobacterium kansasii çoğunlukla fotokromojeniktir, ancak ara sıra suşlar pigmentsiz veya skotokromojenik olabilmektedir. Bazı *M. avium-intracellulare* suşları hafifçe pigmentlidir ve bu bulgular yanlış yorumlanarak sktokromojenik olarak sınıflandırılabilirler. *Mycobacterium szulgai*, 37°C'de sktokromojenik iken 25°C'de

fotokromojeniktir. Bu örneklerde görüldüğü gibi Runyon'un sınıflandırma sisteminde kısıtlılıklar barındırmaktadır (41, 42).

Fenotipik kriterlere güvenmek yanıltıcı olabilmektedir, bu nedenle Woods ve Washington, Wolinski'nin daha önce yayınladığı önermesinden yola çıkarak, mikobakterilerin klinik odaklı sınıflandırmasını önermiştir (41, 42).

Tablo 2. Woods ve Washington Sınıflama Şeması (42).

İnsanlarda Potansiyel Patojen Olan Mikobakteriler	İnsanlarda Nadiren Patojen Olan Saprofit Mikobakteriler
<i>M. avium-intracellulare</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. fortuitum-chelonae</i> kompleks <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i>	Yavaş Üreyenler <i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae-triviale</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i>
	Orta Hızda Üreyenler <i>M. flavescens</i>
	Hızlı Üreyenler <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. paraafortuitum</i> kompleks <i>M. phlei</i>

4.5. TDM'ler ve Çevre İlişkisi

TDM'ler olarak adlandırılan çevresel mikobakteriler; nozokomiyal enfeksiyonlar, immün sistemi baskılanmış hastalardaki akciğer ve yaygın hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda daha sık etken olarak izole edilmeye başlanmıştır (44, 45). Bu enfeksiyonların insandan insana geçişi tespit edilmemiştir. Bu nedenle, doğal ya da insan yapımı çevre bu enfeksiyonların tek kaynağı olarak kabul edilir (44).

TDM'nin toprakta ve suda yaygın olarak bulunup, çok çeşitli hayvan türlerinde kolonileştiği ve hastalığa neden olduğu bilinmektedir (16, 46). ABD'deki çeşitli coğrafi bölgelerden toprak örneklerinin %30-78'inden HÜM izole edilmiştir (47).

İnsan veya hayvanda mikrobiyota bileşeni olmasa da TDM'ler asemptomatik bireylerde deri, üst solunum yolları, bağırsak ve genital yollardan izole edilebilir. Bu nedenle klinik öneme sahip olup olmadıkları, her yerde bulunan doğaları gereği önemli ancak cevaplanması zor bir sorudur (14).

Mikobakteriler arıtılmış içme suyu, hastane ve hemodiyaliz merkezlerindeki su sistemleri, endüstriyel sıcak su sistemleri, buz makineleri, yüzme havuzları, sıcak su havuzları, çiğ süt ve hatta su hasarına maruz kalmış binalardan da izole edilmektedir (45). Bronkoskoplar ve ilgili cihazlar diğer iyi bilinen TDM kaynakları arasında yer almaktadır. Bazı TDM türleri, nozokomiyal hastalık ve/veya yalancı salgınlarla ilişkilidir. Bu yalancı enfeksiyonlardan izole edilen organizmalar arasında *M. tuberculosis* ve *Mycobacterium xenopi* ile diğer TDM türleri bulunmaktadır (14).

Toplum kaynaklı lokalize cilt, yumuşak doku ve/veya kemik hastalığı genellikle potansiyel toprak kirliliği ile travmatik bir yaralanmayı izlerken olası başka bulaş yolları da tozların solunması, toprak veya su yoluyla mikroorganizmaların yutulması ve yutulma ile mideye gelen TDM'lerin gastrik reflü sonrası aspire edilmesidir. TDM'nin akciğer hastalığına yol açan ana bulaş yolu ise aerosollerdir (14, 47).

Mikobakteriler, güneş ışığından korunmaları halinde cansız cisimler üzerinde haftalar hatta aylarca yaşayabilirler. Mikobakteriler, donma veya kuruma ile kolayca öldürülemez, ancak ısı ve ultraviyole (güneş) ışığı ile öldürülebilir. Ayrıca, asitlere, alkalilere ve bazı kimyasal dezenfektanlara diğer sporsuz bakterilerin çoğundan daha dirençlidir (14). Mikobakterilerin klor ve diğer sık kullanılan su arıtma kimyasalları ile yüzey dezenfektanlarına karşı intrensik dirençli olabilmeleri hastanelerde, fabrikalarda ve yerleşim yerlerinde kolonize olmalarını sağlamaktadır (45). Ayrıca, biyofilmler mikobakterileri yaygın olarak kullanılan dezenfektanlara dirençli hale getirebilir (48).

4.6. TDM'lerin Epidemiyolojisi

TDM'lerin hastalığa neden olabileceğinin 1979 yılında Wolinsky tarafından kanıtlanması ile TDM çalışmalarının geçerliliği ve önemi belirtilmiştir (49). Aynı yıl

Denver’da düzenlenen uluslararası konferansta TDM’lerin epidemiyolojisi, patojenitesi, taksonomisi ve moleküler genetiği üzerine yapılan çalışmaların ilk kanıtları sunulmuştur (50). Her iki doküman da TDM’lerin insan ve hayvan hastalıklarındaki rolünü açıklayan pek çok yayın için başlangıç noktası olmuştur (50).

İnsan yapımı su sistemi kullanımının yaygınlaşmasıyla insanların TDM ile temasının artması, immün sistemi zayıflatan ilaçların daha fazla kullanılması, uzun süreli antibiyotik tedavilerindeki artışa bağlı akciğerde TDM’lerin yerleşmesi için uygun zeminin oluşması TDM enfeksiyon oranlarında gerçek bir artış sağlayan olası nedenler arasında bulunmaktadır (51). Bununla birlikte, TDM’lerin insanlardaki patojenitesi ile ilgili farkındalık artışı, kültür ve saptama yöntemlerindeki gelişmeler de bu etkenleri hastalık ile ilişkilendirmemizi kuvvetlendirmiştir (27).

Tüberküloz dışı mikobakteriyel hastalıklar daha çok gelişmiş ülkelerde daha az sıklıkla da gelişmekte olan ülkelere görülür. TB insidansının düşük olduğu ABD ve Avrupa’da, özellikle edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu- ‘*Acquired Immune Deficiency Syndrome*’ (AIDS) hastalarında TDM enfeksiyon insidansı yüksek iken, TB insidansının yüksek olduğu Afrika ve dünyanın diğer gelişmekte olan bölgelerindeki AIDS hastalarında ise TDM insidansı düşüktür (50). Bu durum Afrika’da TDM’lerin bulunmamasından değil, muhtemelen bu bölgedeki AIDS hastalarının tüberküloz dışı mikobakteriyel hastalığın geliştiği aşamaya gelmeden önce başka nedenlerden ölümüne bağlı görülmektedir (50).

Tüberküloz dışı mikobakteriyel hastalıklar birçok sanayileşmiş ülkede görülsede TDM’ler çoğu ülkede bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer almadığı için epidemiyolojik durumu değerlendirmek zordur (2, 50, 52). TDM’ler ile ilgili kapsamlı bilgi sunan Amerikan Toraks Derneği – ‘*American Thoracic Society*’ (ATS) ve Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği – ‘*Infectious Diseases Society of America*’ (IDSA) dokümanında tüberküloz dışı mikobakteriyel hastalık insidans oranının 1.0-1.8/100.000 arasında değişmekte olduğu bildirilmiştir (2).

Veriler Kuzey Amerika ve Avustralya’da yıllık prevalansın 3.2-9.8/100.000 arasında değiştiğini ve prevalansta devam eden bir artış olduğunu göstermektedir (52). Akciğer örneklerinden elde edilen TDM sıklığı ABD’de 1997-2007 yılları arasında %8.2, Kanada’da 1997-2003 yılları arasında %8.4 artış göstermiştir (53). Amerika’da TDM izole edilen örnekler içerisinde akciğer örneklerinin ilk sırada yer aldığı, en sık rapor edilen potansiyel

patojenik türlerin sırası ile *Mycobacterium avium* kompleks (MAK), *M. fortuitum* ve *M. kansasii* olduğu belirtilmiştir (2).

Avrupa'da farklı merkezlerde yapılan çalışmalara göre TDM için; İngiltere-Leeds'de 1995-1999 yılları arasında yıllık yaklaşık 2.9/100.000 izolasyon ve 1.7/100.000 hastalık (27), Hollanda-Nijmegen Arnhem bölgesinde 1999-2005 yılları arasında yıllık yaklaşık 6.3/100.000 izolasyon ve 1.4/100.000 hastalık (54), Danimarka genelinde 1997-2008 yılları arasında yıllık ortalama 2.5/100.000 izolasyon ve 1.1/100.000 hastalık oranları gözlenmiştir (55).

Akciğer örneklerinde TDM incelendiğinde; Güneybatı İrlanda'da 1987-2000 yılları arasında yıllık ortalama 1.9/100.000 izolasyon ve 0.2/100.000 hastalık (56), Yunanistan'da 2004-2006 ve 2000-2009 yılları arasında yapılan iki çalışmada yıllık 7.0/100.000 izolasyon ve 0.6-0.7/100.000 hastalık (57, 58), İskoçya'da 1992-2010 yılları arasında yıllık 1.6/100.000 hastalık (59), Fransa'da 2000-2003 yılları arasında yıllık 0.73/100.000 hastalık oranları bildirilmiştir (60).

Mevcut tahminler Avrupa'da TDM yıllık prevalansın yüzbinde ikinin altında olduğunu göstermekle birlikte, oranlar Kuzey Amerika ve Avustralya'ya kıyasla daha düşüktür (52). Türlerin dağılımı incelendiğinde, Avrupa'da *M. kansasii*, *M. xenopi* ve *Mycobacterium malmoense* daha sık görülmektedir (52).

Orta Doğu ve Güney Asya'da popülasyon temelli çalışmaların olmadığı daha çok tek merkezden gelen verilerin paylaşıldığı görülmektedir. İsrail'de 2004-2010 yılları arasında tek kurumu içeren bir çalışmada akciğer örneklerinde TDM saptanan 215 hastanın %21'inde (45/215) “kesin” veya “olası” hastalık varlığı saptanmış ve bu hastalardan da başlıca *M. kansasii* ve MAK'ın izole edildiği bildirilmiştir (61). 2009-2010 yılları arasında Suudi Arabistan'daki çeşitli laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda akciğer örneklerinden TDM izole edilmiş 73 hastanın %67'sinde (49/73) hastalık varlığı saptanmış ve en sık görülen patojenlerin *M. fortuitum* ve *M. abscessus* olduğu bildirilmiştir (62). Hindistan'ın Mumbai kentinde, 2005-2008 yılları arasında tek kurumu içeren çalışmada 103 hastaya ait akciğer örneklerinde TDM izole edildiği, %65'inde (67/103) “kesin” ya da “olası” hastalık tesbit edildiği ve en sık izole edilen türün *Mycobacterium intracellulare* olduğu bildirilmiştir (63).

Ülkemizde de TDM epidemiyolojisi ile ilgili veriler, tek merkezli çalışmalardan elde edilen bilgilerle sınırlıdır.

2004-2009 yılları arasında akciğer tüberkülozu ön tanılı 19553 hastayı inceleyen tek merkezli çalışmada TDM saptanan 77 hastanın 31 (%0.16)'inde üremeler etken olarak değerlendirilmiş ve çoğunlukla MAK, *M. abscessus* ve *M. kansasii*'nin izole edildiği bildirilmiştir (64).

Dokuz Eylül Üniversitesinde 2004-2010 yılları arasında solunum yolu örneklerinden izole edilen 156 TDM izolatu hsp65 gen bölgesi sekans analizi ile tanımlanmış; *M. abscessus* (%44,2), *M. xenopi* (%16.7), *Mycobacterium peregrinum* (%10.9) ve *M. fortuitum* (%8.3) sırasıyla en sık izole edilen türler olarak belirtilmiştir (65).

Celal Bayar Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada 2007-2011 yılları arasında tüberküloz ön tanısı ile gönderilen 5122 klinik örneğin 126'sında (%2.46) TDM üremesi olduğu belirtilmektedir. Üreyen izolatlardan 101'i DNA dizi analizi ile tanımlanmış ve başlıca izole edilen türler *Mycobacterium porcinum* (%39.60), *Mycobacterium lentiflavum* (%35.65) ve *M. abscessus* olarak bildirilmiştir (66).

Ocak 2009 - Aralık 2010 tarihleri arasında Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında çalışılıp TDM olduğu tespit edilen 75 hastanın değerlendirildiği diğer bir çalışmada *M. fortuitum* (%33.3) en sık izole edilen tür olmuş, bunu *M. abscessus* (%18.7), *Mycobacterium gordonae* (%10.7) ve *M. avium* (%8) izlemiştir (67).

Çukurova Üniversitesinde 2012 Kasım-2014 Eylül tarihleri arasında 21918 klinik örneğin değerlendirildiği çalışmada 76 hastaya ait 93 örnek TDM olarak değerlendirilmiştir. En sık izole edilen TDM türleri *M. abscessus* (%24.7), *M. intracellulare* (%11.8) ve *Mycobacterium simiae* (%10.8) olarak bildirilmiştir (68).

TDM enfeksiyonunun birçok ülkede bildiri zorunlu hastalıklar arasında yer almaması ve sürveyans çalışmalarının kısıtlı olmasından dolayı farklı TDM türleri ile gelişen hastalık insidansı tam olarak bilinmemektedir. Su ve toprak gibi çevrelerde baskın olan türlerin bölgesel farklılığın temelini oluşturduğuna inanılmaktadır (64, 69).

4.7. TDM'lerde Patogenez ve Virülans Özellikleri

TDM patogenezindeki mekanizmalar çok net bilinmemektedir, ancak çevresel mikobakterilerin kısmi veya sistemik bağışıklık kusurları olan bireylerde hastalığa neden olduğu yaygın bir gözlemdir (3).

TDM'lerin antibiyotik geçirmeyen biyofilm oluşturma yeteneği ve LAM gibi glikolipitler bakımından zengin hücre duvarının varlığı virülans için sahip oldukları önemli özelliklerdir. Mikrobiyal biyofilm, mikroorganizmaları bağışıklık hücreleri ve yardımcı moleküllerden ayırıp mikroorganizmaların tanınmasını önleyerek bağışıklık tepkilerini değiştirebilir (70). Ayrıca biyofilm mikroorganizmaların biyolojik olmayan vasküler greft gibi malzemeler üzerinde fiziksel olarak kalmasına izin verir (71). Musluklar, drenajlar ve borular etrafındaki biyofilmlerde veya tıbbi cihazlarda bulunan çevresel mikobakterilerin çoğu geleneksel dezenfektanlara karşı dirençlidir (72). Çevresel mikobakteriler, su sistemleri ve tıbbi malzemelere bağlı salgınlar ile ilişkilendirilmiştir (71).

Mikobakteriler arasında paylaşılan ikinci virülans faktörü sıklıkla LAM ve yakından ilişkili diğer glikolipitlerle süslenmiş kalın ve mumsu bir hücre duvarıdır (71). LAM ve benzer moleküler motifler, konak hücre farklılaşmasında bozulma ve sitokin ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (71).

TDM enfeksiyonları; deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, izole akciğer hastalığı ve visseral/yaygın hastalık olarak geniş bir şekilde sınıflandırılabilir. Hastalık sınıflamasındaki bu ayırım altta yatan bağışıklık anormallik derecesinin hastalıklar arasında değişmesinden dolayı önemlidir. Spektrumun bir ucundaki deri ve yumuşak doku enfeksiyonları neredeyse her zaman TDM'nin cerrahi kontaminasyon ve travma benzeri nedenlerle iyatrojenik veya kazara inokülasyonu sonucunda görülmektedir. TDM akciğer hastalığı olan hastalarda primer akciğer bozukluğu veya bu enfeksiyonlara yatkın sistemik durum varlığı nadir değildir. Spektrumun diğer ucundaki, visseral ve yaygın TDM hastalığı daima şiddetli immünsüpresyonu olan bireylerde ortaya çıkmaktadır (73).

Son yirmi yılda, TDM enfeksiyonlarının patogenezi ile ilgili üç önemli gözlem yapılmıştır:

1. HIV ile enfekte olmuş hastalarda, yaygın TDM enfeksiyonları sadece CD4⁺ T lenfosit sayısı 50/µL'nin altına düştükten sonra meydana gelmektedir. Bu durum spesifik T-hücresi ürünleri veya aktivitelerinin mikobakteriyel direnç için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

2. HIV ile enfekte olmayan hasta grubunda, yaygın TDM enfeksiyonunun genetik sendromları; interferon- γ ve interlökin-12 sentezi ve tepki yollarındaki spesifik mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir.

3. Özellikle menopoz sonrası kadınlarda bronşektaziye bağlı nodüler TDM akciğer enfeksiyonu ile belirli vücut deformiteleri arasında ilişki bulunmaktadır (örneğin: pectus excavatum, skolyoz, mitral kapak prolapsusu) (2).

4.8. TDM'lerin Tanısı

Kronik akciğer hastalığı TDM'nin en sık görülen klinik formudur (2, 74). TDM'ler çevresel organizmalar olduğundan, kültürde saptanması her zaman TDM ilişkili akciğer hastalığının varlığını göstermez (51). TDM akciğer hastalığının belirtileri hastalığa özgü olmayıp, altta yatan akciğer patolojisini yansıtmaktadır (2).

4.8.1. TDM'lerde Klinik Tanı Kriterleri

TDM'lerin neden olduğu akciğer hastalıklarının tanısında 2007 yılında ATS ve IDSA tarafından klinik/ radyolojik/ mikrobiyolojik kriterlerin birlikte kullanılmasını esas kılan kriterler belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. TDM akciğer hastalığı tanısında klinik ve mikrobiyolojik kriterler (2).

<p>Klinik (her iki kriter de gereklidir)</p> <p>1. Akciğer semptomları, akciğer filminde nodüler ya da kaviteli opasiteler ya da yüksek çözünürlüklü bir bilgisayarlı tomografide çok odakta bronşektazi ve küçük çok sayıda nodüller</p> <p style="text-align: center;">ve</p> <p>2. Diğer tanıların uygun şekilde dışlanması</p> <p>Mikrobiyolojik</p> <p>1. En azından iki farklı balgam örneğinde pozitif kültür sonucu. Eğer bunlar tanısız değilse, tekrar balgam aside dirençli bakteri (ARB) yayma ve kültürün yapılması düşünülmelidir.</p> <p style="text-align: center;">ya da</p> <p>2. En azından bir bronş lavajı ya da yıkamasından pozitif kültür</p> <p style="text-align: center;">ya da</p> <p>3. Transbronşiyal ya da diğer akciğer biyopsisinde mikobakteri histopatolojik özellikleri (granülomatöz inflamasyon ya da ARB) ve TDM için pozitif kültür ya da biyopside mikobakteri histopatolojik özellikleri (granülomatöz inflamasyon ya da ARB) ve bir ya da daha fazla balgamda ya da bronş yıkamasında TDM için kültür pozitif olması</p> <p>4. Nadiren görülen ya da genellikle çevresel kontaminasyonu yansıtan TDM üretildiğinde uzman görüşüne başvurulmalıdır.</p> <p>5. TDM olan ya da şüphelenilen fakat tanı kriterlerine uymayan hastalar, tanı kesin olarak konulana ya da dışlanana kadar izlenmelidir.</p> <p>6. TDM hastalığı tanısı koymak her zaman tedavi başlamayı gerektirmez; tedavi başlamak için her bir hasta için tedavinin potansiyel riskleri ve yararları için bir karara varılmalıdır.</p>

Bu kriterler en çok MAK, *M. kansasii* ve *M. abscessus*'un neden olduğu akciğer hastalıklarına uymaktadır (2).

4.8.2. TDM'lerde Mikrobiyolojik Tanı

Uygun tedavi yaklaşımlarının seçilmesi ve epidemiyolojik verilerin elde edilmesi açısından TDM türlerinin laboratuvar tanısı büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla geleneksel

yöntemlerin yanı sıra birçok ticari hızlı kültür sistemi ve moleküler yöntemler geliştirilmiştir (16, 75).

4.8.2.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Mikobakterilerin doğru mikrobiyolojik tanısının sağlanmasında tanı yöntemleri kadar örneklerin analiz öncesi evrede uygun şekilde seçilmesi, uygun yöntemlerle ve yeterli miktarlarda alınması, belirli kurallar çerçevesinde laboratuvara transportu ve en kısa sürede işlenmesi de önem taşımaktadır. Örnek alımı sırasında, endojen flora ve çevresel kontaminasyonu azaltmak için aseptik koşullar sağlanmalıdır (14, 76). Örneklerin fiksatif içermeyen, steril, sızdırmaz, tek kullanımlık ve etiketli kaplarda toplanması ve rutin güvenlik önlemlerine uyulması önemlidir. Taşıyıcı besiyeri ve koruyucular genellikle önerilmez. Laboratuvara ulaşım süresi bir saatten uzun olursa örneğin 4°C’de saklanması tercih edilmektedir. Makrolid ve kinolonlar gibi yaygın olarak kullanılan antibiyotikler TDM üremesini baskılayıcı etki yapabildiğinden mümkünse örnek alımı sırasında antibiyotik kullanımı sınırlandırılmalıdır (2, 14).

Mikobakteriyolojik inceleme için laboratuvara gönderilen örneklerin büyük kısmı solunum yolu kaynaklı (ekspektore veya indüklenmiş balgam, açlık mide sıvısı, trakeal ve bronşiyal aspirat, bronş lavajı, bronkoalveolar lavaj, bronşiyal fırçalama, larinks sürüntüsü örnekleri) olmakla birlikte idrar, gastrik aspiratlar, doku, biyopsi, apse ve yara örnekleri ile normalde steril olan beyin omurilik sıvısı, plevral ve perikardiyal aspirat gibi vücut sıvıları diğer yaygın gönderilen örnekleri oluşturmaktadır. Kan ve dışkı örnekleri ise immünsüprese hasta grubunda gönderilebilmektedir (14, 76).

Kontamine bölgelerden alınan örnekler TDM’lerden daha hızlı üreyebilen mikroorganizmaları içerebileceğinden mikobakteri üremesi engellenebilir. Bakteri ve mantarlarla aşırı üremenin veya kontaminasyonun en aza indirilmesi için steril olmayan bölgelerden alınan veya kontamine olduğu düşünülen örneklerle homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinin uygulanması gerekir (2, 14).

Bu amaçla yaygın olarak N-Asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) yöntemi kullanılmaktadır. Ayrıca; %4’lük NaOH, zefiran-trisodyum fosfat, oksalik asit, setilpridinyum klorid-sodyum klorid ve sülfirik asit gibi yöntemler de mevcuttur. NALC-NaOH yönteminde; NALC mukolitik, NaOH dekontaminant olarak, sodyum sitrat ise klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC’ın inaktivasyonunu önlemek

amacıyla kullanılır (14, 76). Çözeltiler hazırlanırken konsantrasyonlarına dikkat edilmeli ve hazırlanmış olan NALC solüsyonu 24 saatten uzun süre bekletilmemelidir. Bu yöntemde; 50 mL'lik steril plastik tüplere, 5-10 mL örnekle eşit hacimde NALC-NaOH eklenerek vorteks aracılığıyla iyice karışması sağlandıktan sonra 15 dakika beklenmektedir. Daha sonra nötralizasyon amacıyla fosfat tamponu eklenmektedir. Konsantrasyon amacıyla santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen çökelti üzerine 1-2 mL fosfat tamponu veya %0.85 NaCl çözeltisi eklenmektedir. Hazırlanan bu karışımdan uygun besiyerlerine ekim yapıp, preparatlar hazırlanmaktadır (14, 76). NaOH mikobakterileri baskılayabileceği için, örneğin NaOH solüsyonu ile temas süresine dikkat edilmelidir (76, 77). Kistik fibrozis (KF) ya da bronşektazili hastaların, aerop gram negatif basiller, özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ile kontamine örneklerinde sıklıkla NALC-NaOH ve %5'lik oksalik asit yönteminin beraber kullanılması önerilmektedir. TDM'ler oksalik asit ile dekontaminasyona hassas olabileceği için, başka bir seçenek olarak, oksalik asiti sadece TDM dışı bakterilerin aşırı üreyebileceği örneklerde kullanmak üzere sonraya saklayan bir yaklaşım benimsenebilir. TDM'ler, özellikle HÜM'ler, *M. tuberculosis* kompleks ile kıyaslandığında dekontaminasyona oldukça duyarlıdır, bu nedenle bu işlemler örnekte potansiyel olarak bulunabilecek mikobakterilerin varlığını ortadan kaldıracak düzeyde olmamalıdır (2).

4.8.2.2. Mikroskopik Değerlendirme

Mikroskopik inceleme hızlı tanı amacıyla kullanılan basit, ucuz ve kolay bir yöntemdir. Özgüllüğü yüksek olan yöntemin duyarlılığı örnek türü ve kalitesine, içerdiği bakteri miktarına, uygulanan tekniğe ve uygulama ve değerlendirmeyi yapan kişiye bağlı olarak %20-85 arasında değişebilmektedir. İncelemede ARB pozitifliği için örneğin mL'sinde 5000- 10000 basil olması gerekmektedir (76, 77).

Klinik örnekte ARB varlığını araştırmak için başlıca kullanılan iki boyama yöntemi;

1. Karbol fuksin boyama (EZN, Kinyoun): Işık mikroskopunda incelenir. Aside dirençli basiller mavi zeminde kırmızı renkte görülür.
2. Florokrom boyama (Auramine O, Auramine-Rhodamine): Floresan mikroskopta veya Led ataçmanlı ışık mikroskopunda incelenir. Aside dirençli basiller karanlık zeminde sarı-turuncu renkte floresans verir (76, 77).

Karbol fuksin boyalı preparatlar x1000 büyütmede, florokrom boyalı preparatlar ise x250-x400 büyütmede incelenir, daha küçük objektiflerle daha geniş alan taraması sağlanır ve tarama süresi azalır. Karbol fuksin boyama sonucunu negatif olarak raporlamak için en az 300 alan taraması gerekli iken, florokrom boyamada x250 büyütmede en az 30, x400 büyütmede ise en az 70 alanın incelenmesi gereklidir. Florokrom boyama daha duyarlı olmasına rağmen artefaktların varlığında yalancı pozitiflik olasılığı bulunmaktadır. Yayımda pozitiflik saptanması durumunda, boyama yöntemi belirtilerek, gözlenen basil sayısına göre skorlama yapılmaktadır (Tablo 4).

Tablo 4. Karbol fuksin ve florokrom yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi ve sonuçların bildirilmesi (76).

Sonuç	Görülen ARB sayısı / Mikroskop alanı		
	Karbol fuksin boyama (1000x)	Florokrom boyama (250x)	Florokrom boyama (400x)
ARB görülmedi	Negatif	Negatif	Negatif
Şüpheli (Yeni örnek ile tekrar edilmeli)	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
+	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
++	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
+++	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
++++	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/1 alan

Florokrom yöntemiyle pozitiflik saptandığında, karbol fuksin yöntemiyle doğrulandıktan sonra raporlanmalıdır. Pozitif yaymalar, derecesine göre ‘ARB pozitifliği’ olarak, örneğin kabulünden sonra en geç 24 saat içinde raporlanmalı ve ilgili hekime telefonla bildirilmelidir (76, 77). Bazı durumlarda, TDM’ler, özellikle HÜM’ler, dekolorizasyon aşamasına daha duyarlı olabilir ve florokrom boyalarla boyanmayabilir. Bu nedenle HÜM şüphesi halinde daha zayıf dekolorizasyon işlemi uygulamak daha uygun olabilir (2, 77). Mikroskopi duyarlılığı düşük olduğu ve ilaç duyarlılık testi yapılabilmesi

için mutlaka altın standart olan kültür yöntemi uygulanmalı, mikroskopi tanıda tamamlayıcı olmalıdır (76, 77).

4.8.2.3. Kültür Yöntemleri

Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen mikobakterilerin tanısında altın standarttır. Hızlı moleküler tekniklere rağmen, mikobakterilerin saf kültürünün eldesi, ADT yapılabilmesi, suşların tiplendirilmesi ve epidemiyolojik çalışmaların yapılabilmesi için kültür yöntemlerine ihtiyaç bulunmaktadır. Kültürde mikobakterilerin üremesi için hasta örneklerinin mililitresinde 10-100 canlı basilin olması yeterlidir. Mikobakterilerin kültürü yapılırken katı ve sıvı besiyerlerinin birlikte kullanılması önerilmektedir (76-78).

Katı Besiyerleri

Katı besiyerlerinin (tüpte veya plakta) avantajı karışık üremeleri ve kontaminantları saptamaya elverişli olmaları ve koloni morfolojilerinin gözlemlenmesine imkan sağlamalarıdır. Yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki tip katı besiyeri kullanılmaktadır (2, 77, 78).

Yumurta Bazlı Besiyerleri

Yumurta bazlı besiyerleri tam yumurta veya yumurta sarısı, patates unu, gliserol ve tuzları içerir. Bu besiyerleri iyi tampon kapasitesi ve uygun saklama koşullarında uzun raf ömrüne (buzdolabında birkaç ay) sahip olup birçok mikobakteri türünün etkin bir şekilde üremesine imkan sağlar. Ayrıca mikobakterilere toksik olan inokulumda ve besiyerinde bulunan maddeler nötralize edilmiştir. Bu besiyerlerinin dezavantajları ise kullanılan yumurtanın kalitesine bağlı besiyerinin kalitesinin değişebilmesi, kolonilerle hasta materyalinin ayrımında güçlükler yaşanabilmesi, duyarlılık testi için uygun ve doğru ilaç konsantrasyonuna ulaşmada zorluklar olabilmesidir. Ayrıca yumurta bazlı besiyerleri kontamine olduklarında sıvılaşabilir. Yumurta bazlı besiyerlerinden LJ besiyeri en yaygın kullanılan besiyeridir. LJ besiyerinin içerdiği malaşit yeşili kontaminant bakteri ve mantarların üremesini inhibe etmektedir. LJ besiyeri *M. tuberculosis*'i diğer türlere nazaran daha iyi üretmektedir. Çoğu TDM türü ise sıvı besiyerleri ile karşılaştırıldığında yavaş üremektedir. *M. tuberculosis*'in bölünme süresi uzun olduğundan inkübasyon süresi 8 haftaya tamamlanmalıdır. American Thoracic Society besiyeri LJ besiyerinden daha düşük konsantrasyonda malaşit yeşili içerdiği için kontaminantlar kolayca üreyebilmektedir. Ancak

mikobakteri üremesinin inhibisyonu azaldığı için kolonilerin kısa sürede üremesi sağlanmaktadır. Petraghani besiyeri ise LJ besiyerinin yaklaşık iki katı kadar malaşit yeşili içerdiği için ciddi ölçüde kontamine olmuş örneklerden mikobakteri izolasyonunda kullanılabilir (14, 78, 79).

Agar Bazlı Besiyerleri

Yumurta bazlı besiyerleri ile karşılaştırıldığında agar bazlı besiyerlerinde kontaminantlar daha zor üremektedir. Ancak bu besiyerleri daha pahalı olup uygun saklama koşullarında raf ömürleri (yaklaşık bir ay) daha kısa sürmektedir. Aşırı sıcak veya ışık maruziyeti besiyerlerinin bozulmasına ve mikobakterilere toksik olan formaldehit salınımına yol açabileceği için besiyerlerinin hazırlanması, saklanması ve inkübasyonunda dikkatli olmak gerekir. Ortalama üreme süresi; yumurta bazlı besiyerlerinde 21-42 gün iken, agar bazlı besiyerlerinde 18-28 gündür. Agar bazlı besiyerleri şeffaf olup erken üreyen mikroskopik kolonilerle inokulum artıklarının kolayca ayırılmasına olanak sağlar. Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar sık kullanılan agar besiyerleridir. Middlebrook 7H11, güç üreyen ve izoniazid dirençli *M. tuberculosis* üremesini sağlayan kazein hidrolizat ilavesi içerdiği için daha yaygın kullanılmaktadır. Agar plağının yüzeyinin daha büyük olması ve 7H10 ile 7H11 besiyerlerinde üremenin daha iyi oluşu nedeniyle duyarlılık testinde dirençli popülasyon yüzdesi daha kolay belirlenebilmektedir. %2 gliserol içeren Middlebrook besiyeri MAK üyesi mikroorganizmaların üremesini güçlendirmektedir. *Mycobacterium genavense*, 7H11 agarda normalde ürememektedir ancak mikobaktin J ilaveli Middlebrook 7H11 agar besiyeri üremesini desteklemektedir (14, 76, 78, 79).

Seçici Besiyerleri

Antimikrobiyal ajanların katı besiyerlerine ilavesi kontaminantların üremesini engellemede yardımcı olabilmektedir. Bu amaçla hazırlanan seçici besiyerleri bulunmaktadır. Bunlar arasında penisilin ve nalidiksik asit içeren LJ Gruft besiyeri; sikloheksimid, linkomisin ve nalidiksik asit içeren Mikobaktosel LJ besiyeri ve karbenisilin (özellikle *Pseudomonas* türlerinin inhibisyonunda), polimiksin B, trimetoprim laktat ile amfoterisin B içeren Mitchison'un seçici 7H11 besiyeri sayılabilir. Belirli bir örnek için seçici besiyeri kullanılacaksa tek başına kullanılmamalı, seçici olmayan agar veya yumurta bazlı besiyerleriyle birlikte kullanılmalıdır (14, 78).

Sıvı Besiyerleri

Sıvı besiyerleri mikobakterilerin hem primer izolasyonu hem de stok suşlarının canlandırılması, ilaç duyarlılık testi ve diğer in-vitro testler için inokulum hazırlanmasında kullanılmaktadır. Sıvı besiyerlerinde ortalama üreme süresi 7-14 gün sürmekte, katı besiyerlerine göre daha hızlı sonuçlanmaktadır. Aynı zamanda mikobakteri izolasyon oranları daha yüksektir. Bu amaçla Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albümin besiyerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. 7H9 besiyeri birçok biyokimyasal test için temel besiyeri görevi görmektedir. Sıvı besiyerine eklenebilen Tween 80, mikobakterilerin daha homojen üremesine imkan vermekte ve mikobakteri kümelerinin dağılmasını sağlayarak sürfaktan görevi yapmaktadır. Günümüzde basit tüplerden tam otomatize sistemlere kadar mikobakteri izolasyonu amacıyla üretilen birçok hızlı ticari sıvı kültür sistemi mevcuttur. Uzun yıllar boyunca kullanılan BACTEC 460 sistemi (Becton-Dickinson, ABD) radyoaktif madde içeriği nedeniyle üretici tarafından artık üretilmemekte ve rutin laboratuvarlarda kullanılmamaktadır (14, 76, 78).

BACTEC MGIT (*Mycobacteria growth indicator tube*) 960 sistemi (Becton-Dickinson, ABD), BBL MGIT yedi mL sıvı kültür besiyerlerinin kullanıldığı radyometrik olmayan tam otomatize yüksek kapasiteli bir sistemdir. MGIT besiyerleri, modifiye Middlebrook 7H9 içermekte ve mikobakteri üremesini saptamak için besiyeri tüpünün dip kısmında silikona gömülü rutenyum pentahidrat içeren floresan-söndürme temelli oksijen sensörü bulunmaktadır. Başlangıçta besiyerinde bulunan yüksek miktarda oksijen, sensörün floresan yayılımını engellemektedir. Mikobakteriler veya diğer mikroorganizmaların üremesine bağlı olarak besiyerinde oksijen miktarı azalmakta, 365 nm dalga boyunda gönderilen ultraviyole ışığında tüpler floresan yaymaktadır. Sistem, devamlı olarak tüplerdeki floresan artışını görüntülemekte ve üreme indeksi - 'growth unit' (GU) olarak kaydetmektedir. GU değeri eşik değeri aştığında cihaz pozitif sinyal vermektedir. Kullanımdan önce MGIT besiyerlerine oleik asit- albümin- dekstroz ve katalaz içeren üreme desteği ve kontaminant mikroorganizmaların üremesini engelleyen polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin içeren antibiyotik karışımı eklenir. Üreme desteğinde yer alan oleik asit mikobakteri metabolizmasında, albümin mikobakterilere toksik olan serbest yağ asitlerinin etkisizleştirilmesinde, dekstroz enerji sağlanmasında ve katalaz ortamdaki toksik peroksitlerin uzaklaştırılmasında kullanılır.

MGIT 960 sisteminin duyarlılığı ve üreme saptama süreleri geçmişte kullanılan BACTEC 460 TB'ye benzer olmakla beraber katı besiyerlerinden üstündür. Ancak büyük olasılıkla besiyerine ilave edilen üreme desteği nedeniyle kontaminasyon oranları BACTEC 460 TB sisteminden daha yüksektir. MGIT 960 sisteminin en önemli avantajları; çapraz kontaminasyonun düşük olması, enjektör ile inokülasyona gerek duyulmaması ve radyoizotop barındırmamasıdır. Yüksek kontaminasyon oranları, kan veya kanlı örneklerle floresanın maskelenmesi ve bazı dekontaminasyon-homojenizasyon yöntemleriyle uyumsuz olması MGIT 960 sisteminin dezavantajlarıdır (14, 77, 78, 80, 81).

Bazı TDM türleri üremek için özel maddelere ihtiyaç duymakta ve güç üremektedir. *Mycobacterium haemophilum* ferrik amonyum sitrat, hemin veya hemoglobin gibi demir içeren bileşiklerin ilave edildiği besiyerlerinde üreyebilmektedir. *M. genavense* ve *M. avium* subsp. *paratuberculosis* mikobaktin J'ye ihtiyaç duymaktadır. *M. ulcerans* ise yumurta sarılı besiyerinde üremektedir (2, 14).

TDM kültürleri için optimal sıcaklık 28-37°C arasındadır. Çoğu klinik olarak önemli yavaş üreyen mikobakteri türünün primer izolasyonunda 35-37°C yeterli olmaktadır, ancak *M. haemophilum* 22-30°C, *M. ulcerans* 25-33°C ve bazı *M. chelonae* suşları 28-33°C arası sıcaklığa ihtiyaç duymaktadır. HÜM türleri ve *M. marinum* kültürleri 28-30°C'de inkübe edilmelidir. Deri, eklem sıvısı ve kemik örneklerinin kültürleri 28-30°C ve 35-37°C'de inkübe edilmelidir. Tüm türlerin kültürden eldesi için iki farklı sıcaklıkta inkübe edilen kültür setleri gerekebilmektedir. Çoğu TDM türü 2-3 hafta içinde, HÜM türleri ise çoğunlukla yedi gün içinde üremektedir. Mikobakterilerin üreme zamanı, HÜM türlerinin izolasyonunu ortaya koyabileceği için mutlaka kayıt altına alınmalıdır (2).

4.8.2.4. TDM'lerin Tanımlanması

TDM enfeksiyonlarına has klinik bulgular olmadığı için kesin tanı mikrobiyolojik inceleme ile konulmaktadır. MTK - TDM ayırımı tedavi seçimine doğrudan etki etmesi bakımından önemlidir. TDM'ler tanımlanırken hem fenotipik hem de genotipik özelliklerden faydalanılmaktadır. 1980'li yıllara kadar fenotipik özellikleri temel alan testler sıklıkla kullanılırken, günümüze kadar uzanan süreçte moleküler yöntemlerin kullanımı yoğunlaşmıştır (16, 82).

4.8.2.4.1. Fenotipik Yöntemler

TDM'lerin tanımlanmasında başlıca üreme süreleri, üreme ısıları, koloni morfolojileri ve pigmentasyon özellikleri ile birçok biyokimyasal test temel alınmaktadır. Bu testler arasında; arilsülfataz üretimi, %5 NaCl toleransı, nitrat redüktaz aktivitesi, demir alımı, katalaz, niasin akümülyasyonu, pirazinamidaz ve üreaz üretimi, tiofen-2 karboksilik asit hidrazid ile üremenin inhibisyonu, tellürit redüksiyonu ve tween-80 hidrolizi sayılabilir (Tablo 5) (14, 77).

Arilsülfataz aktivitesi: Arilsülfataz enzim aktivitesinin belirlenmesi, HÜM türlerinin grup III fotokromojenik olmayan mikobakterilerden ayırımında yardımcıdır. *M. marinum*, *M.kansasii*, *M. szulgai* ve *M. xenopi* enzimi az miktarda üretebilirler. Ancak bu yavaş üreyen türlerde pozitif sonuç verecek yeterlilikte enzim üretimi gerçekleşmemektedir (41).

Sodyum klorür tolerans testi: 28⁰C'de inkübe edildiğinde, %5'lik NaCl içeren yumurta bazlı besiyerinde üreyebilme yeteneği, *Mycobacterium triviale*, *Mycobacterium flavescens*'in bazı suşları, *M. abscessus* ve *M. fortuitum* için ortak özelliktir (41).

Nitrat redüktaz aktivitesi: Mikobakteriler nitroredüktaz enzim üretimiyle nitratları nitritlere indirgeyebilirler. *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *Mycobacterium smegmatis* ve *M. fortuitum* grubu nitrat redüktaz pozitifdir (41).

Demir alımı: *M. fortuitum*'un kültür besiyerinde çözünür demir tuzlarını alma yeteneği ve sıvı %20 ferrik amonyum sitrat ilavesi ile paslı kahverengi bir görünüm oluşturması, *M. fortuitum* ile bu özellikten yoksun olan *M. chelonae/abscessus* grubunu ayırt etmede kullanışlı bir özelliktir (41).

Katalaz aktivitesi: Mikobakterilerin çoğu katalaz üretir, 20 dakika boyunca 68⁰C'de ısıtıldıktan sonra tüm türler pozitif bir reaksiyon üretmez (ısıya dayanıklı katalaz). Bazı INH-dirençli suşlar hariç *M. tuberculosis* suşlarının çoğu ve MTK'nın diğer üyelerinin, ısıya dayanıklı katalaz testi negatiftir. Semikantitatif testte ise hava kabarcıklarının yüksekliğinin 45 mm'den yüksek olması pozitif bir reaksiyonu ifade eder. Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılan hidrojen peroksit, diğer bakterilerde bulunan enzimin araştırılmasında kullanılan ayıraçtan farklıdır. Hidrofobik ve kümeli olan mikobakterilerin

dağılmasını ve enzimin kolayca açığa çıkmasını sağlamak için testte %30 H₂O₂ ile güçlü bir deterjan olan %10 Tween 80'nin karışımı kullanılır (41, 83).

Niasin akümülyasyonu: Bu test *M. tuberculosis*, *M. simiae* ile nadiren *M. africanum*, *Mycobacterium bovis*, *M. marinum* ve *M. chelonae* suşlarının diğer mikobakterilere göre niasini daha az metabolize etmeleri sonucu besiyerine saldıkları niasini bazı kimyasallarla tespit etme esasına dayanmaktadır (41).

Pirazinamidaz üretimi: Pirazinamidaz enzimi, pirazinamidi pirazinoik asite deamine eder. Pirazinoik asit, besiyerine ferröz amonyum sülfat eklenmesi ile saptanabilir. Bu test, *M. marinum*'u *M. kansasii*'den ve *M. bovis*'i *M. tuberculosis*'den ayırt etmede yardımcıdır. *M. bovis* ile *M. kansasii* negatif sonuç vermektedir (41, 83).

Üreaz testi: Üreaz aktivitesinin değerlendirilmesi, *Mycobacterium scrofulaceum* (pozitif) ile *M. gordonae* (negatif), *Mycobacterium gastri* (pozitif) ile diğer grup III kromojen olmayan mikobakterilerin ayırımında yardımcıdır (41).

Tiofen-2 karboksilik asit hidrazid (T2H) ile üremenin inhibisyonu: T2H, seçici olarak *M. bovis*'in üremesini inhibe ederken, *M. tuberculosis* dahil çoğu mikobakteri T2H içeren besiyerinde üremeyi sürdürmektedir (41).

Tween-80 hidrolizi: Bazı mikobakteriler tarafından üretilen lipazlar, tween-80'i hidrolize ederek polioksietile sorbitol ve oleik asit açığa çıkarır. *M. kansasii*, 3-6 saat kadar kısa sürede pozitif sonuç vermektedir. Benzer koloni görünümüne sahip skotokromojenler, *M. gordonae* (pozitif) ve *M. scrofulaceum* (negatif) bu test ile ayırt edilebilir. pH'sı yedi olan test besiyerindeki nötral kırmızısı tween-80 tarafından bağlanır ve nötral pH'da kehribar rengindedir. Tween-80 hidrolize olursa nötral kırmızı artık bağlı olmadığı için pH yedide kırmızı renge döner (41).

MacConkey agarda üreme: Kristal viyole içermeyen MacConkey agar HÜM'lerin üremesini desteklerken, çoğu mikobakteri bu besiyerinde üreyemez. *M. fortuitum*, *M. chelonae* ve *M. abscessus* ile diğer mikobakterilerin ayırımında kullanılabilir (41). TDM'lerin tanımlanmasında kullanılan bu biyokimyasal testler ile ancak belli türler ayırt edilebilmektedir. Ayrıca kesin tanımlama için testlerin çoğunun birlikte uygulanması gerektiğinden ve uzun süreye ihtiyaç duyulduğundan günümüzde konvansiyonel biyokimyasal testler rutin kullanımda fazla yer bulmamaktadır (16).

Tablo 5. Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal özellikler (77)

Tanımlayıcı terim	Organizma	Optimal Sıcaklık (°C)	Olagan koloni morfolojisi	Pigmentasyon	Niasin	TZH ile üreme	Nitrat redüksiyonu	Semikuantitatif katalaz (kabarçıklanım mm/s)	68°C'de Tween hidrolizi katalaz	Tellürit redüksiyonu	%5 NaCl toleransı	Demir alımı	Anisülflaz 3 günlük	MacConkey agarda üreme	Üreaz	Pirazinamidaz 4 günlük
Yavaş üreyenler																
<i>M. tuberculosis</i> kompleksi	<i>M. tuberculosis</i>	37 R	N	N	+	+	+	<45	-	+/-	-	-	-	-	±	+
	<i>M. affricum</i>	37 R	N	N	-	V	-	<45	-	-	-	-	-	-	+	-
	<i>M. bovis</i>	37 Rt	N	N	-	-	-	<45	-	-	-	-	-	-	±	-
	<i>M. bovis BCG</i>	37 R	N	N	-	-	-	<45	-	+/-	-	-	-	-	+	-
	<i>M. avium</i> kompleksi	37 St/R	N	N	-	+	+	<45	±	-	-	-	-	-/+	-	+
	<i>M. xenopi</i>	42 S	S	S	-	+	+	>45	±	-	-	-	-	-	-	V
	<i>M. haemophilum</i>	30 R	N	N	+	+	+	<45	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>M. malmoense</i>	37 S	N	N	-	+	+	<45	-/+	+	+	-	-	-	-	+
	<i>M. simioidei</i>	37 R	N	N	-	+	+	<45	-	+	+	-	-	-	-	+
	<i>M. genavense</i>	37 St	N	N	-	+	+	>45	+	+	-	-	-	-	+	+
Kromojen olmayanlar	<i>M. celatum</i>	37 S/St	N	N	-	+	+	<45	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>M. nielsenii</i>	30 R	N	N	-	+	+	<45	+	-	-	-	-	-	V	-
	<i>M. terae</i> kompleksi	37 SR	N	N	-	+	+	>45	+	-/+	-	-	-	V	-	V
	<i>M. trivale</i>	37 R	N	N	-	+	+	>45	+	+	+	-	-	-	-/+	V
	<i>M. gastri</i>	30 S/SR/R	N	N	-	+	+	<45	-	+	-	-	-	-	-/+	-
	<i>M. kansasii</i>	37 SR/S	P	P	-	+	+	>45	+	-/+	-	-	-	-	-/+	-
	<i>M. marinum</i>	30 S/SR	P	P	-/+	+	+	<45	-	-/+	-	-	-	-	-/+	+
	<i>M. simiae</i>	37 S	P	P	±	+	+	>45	+	+	+	-	-	-	±	+
	<i>M. asiaticum</i>	37 S	P	P	-	+	+	>45	+	+	-	-	-	-	-	-
	<i>M. xenopi</i>	42 S	N/S	N/S	-	+	+	<45	+/-	-	-	-	-	-	-	-
Hızlı üreyenler	<i>M. goodii</i>	37 S	S	S	-	+	+	>45	+	-	-	-	-	-	V	-/+
	<i>M. scrofulaceum</i>	37 S	S	S	-	+	+	>45	+	±	-	-	-	-	V	±
	<i>M. szulgai</i>	37 S veya R	S/P	S/P	-	+	+	>45	+	-/+	-	-	-	-	V	+
	<i>M. flavescens</i>	37 S	S	S	-	+	+	>45	+	+	±	-	-	-	-	+
	<i>M. fortituum</i> grup	28 R/S	N	N	-	+	+	>45	+	-/+	+	+	+	+	+	+
	<i>M. chelonae</i>	28 S/R	N	N	-/+	+	+	>45	±	-/+	V	-	-	-	+	+
Kromojen olmayanlar	<i>M. abscessus</i>	28 S/R	N	N	-	-	-	>45	V	-	±	-	-	+	+	+
	<i>M. microgenitum</i>	28 S	N	N	-	-	-	>45	+	+	-	-	-	+	+	+
	<i>M. smegmatis</i>	28 S/R	S	S	-	+	+	<45	-	+	+	+	-	+	+	+
	<i>M. phlei</i>	28 R	S	S	-	+	+	>45	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>M. vaccae</i>	28 S	S	S	-	+	+	>45	+	+	V	+	-	-	-	-

V: Değişken, ±: Genellikle mevcut, -/+ : Genellikle mevcut değil.

R: Düzensiz, S: Düzgün, SR: orta düzenli, t: zayıf veya transparan.

P: Fotokromojen, S: Skotokromojen, N: Krom

4.8.2.4.2. İmmünokromatografik Yöntem

Kültür sırasında salınan baskın proteinlerden olan MTK'ya özgü MPT64 antijenini, MPT64 spesifik monoklonal antikör aracılığıyla, immünokromatografik temelli yöntem ile saptamaya dayanmaktadır. Yaklaşık 15 dakikada sonuç veren kalitatif test, kontrol ve test bantlarının pozitifliğine göre MTK-TDM ayırımında kullanılmaktadır. Hem katı hem de sıvı kültürden çalışılabilen ek işlem ve ekipman gerektirmeyen test basit, uygulaması kolay, güvenilir, hızlı ve düşük maliyetlidir (76, 84, 85).

4.8.2.4.3. Moleküler Yöntemler

Mikroskopi ve kültür yöntemleri mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında günümüzde halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak, çoğu mikobakteriyoloji laboratuvarında kültürde üreyen mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu için zaman alıcı ve zahmetli biyokimyasal testlerin kullanımı azalmıştır. Günümüzde moleküler biyoloji temelli kültür dışı yöntemler *Mycobacterium* türlerinin laboratuvar tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmanın genomunda yer alan iyi korunmuş, yalnızca o mikroorganizmaya özgü dizilerin hedef alınması aracılığıyla tiplendirme yapılması, moleküler yöntemlerin temelini oluşturmaktadır. TDM'lerin laboratuvar tanısında; nükleik asit hibridizasyon yöntemleri, polimeraz zincir tepkimesi (PZT)-restriksiyon enzim analizi yöntemi (PRA) ve DNA dizi analizi gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır (41, 86).

4.8.2.5. HÜM Türlerinin Tanımlanması

İzolatin klinik önemini belirlemek her zaman çok kolay olmadığı için TDM lerin tür düzeyinde tanımlanması giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu nedenle, HÜM türlerinin tür düzeyinde tanımlanması önerilmektedir (87).

4.8.2.5.1. Biyokimyasal Yöntemler

Önceden tarif edildiği gibi, yedi gün içinde üreyen TDM'ler HÜM türleri olarak tanımlanmaktadır. Arilsülfataz (üç gün), demir alımı, nitrat redüktaz, %5 NaCl toleransı ile mannitol, inozitol ve sitrat karbonhidrat utilizasyonu sık karşılaşılan HÜM türlerinin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testlerden bazılarıdır. Karbonhidrat utilizasyonu, sık karşılaşılan türler ve bazı yeni bulunan türlerin ayırımında daha doğru tanımlamaya izin vermektedir. *M. chelonae/abscessus* grup ve *M. fortuitum* grubun tüm üyeleri üç günde güçlü arilsülfataz aktivitesi gösterirken, *M. smegmatis* grup (*M. smegmatis* ve

Mycobacterium goodii) ve *M. wolinskyi* üç günde arilsülfataz aktivitesi göstermemektedir. Ayrıca, *M. smegmatis* grup pigment üreten tek gruptur. *M. smegmatis* izolatlarının yaklaşık %95'i ile *M. goodii* izolatlarının %80'i 7-10 günden sonra sarı pigmentasyon göstermektedir (14, 47, 87).

4.8.2.5.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Tanımlama – ‘High performance liquid chromatographic identification’ (HPLC)

Mikobakteri hücre duvarı mikolik asitlerinin HPLC ile analizi birçok laboratuvarında TDM izolatlarının tanımlanmasında kullanılsa da HÜM türlerinin tanımlanmasında sorunludur. *M. fortuitum* grup ile *M. smegmatis* grubun *M. chelonae/abscessus* gruptan ayırımında kabul edilebilir bir yöntem olmakla birlikte izolatların tür düzeyinde tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Sadece HPLC ile HÜM türlerinin tanımlanması yeterli olmamakla birlikte, başka yöntemlerle kombinasyonu HÜM türlerinin tanımlanmasına yardımcı olabilir (14, 47, 87).

Gün geçtikçe yeni türlerin tanımlandığı gerçeği göz önünde bulundurulduğunda tür düzeyinde kesin tanımlamanın moleküler teknikler olmadan yapılması mümkün görünmemektedir (47).

4.8.2.5.3. Moleküler Yöntemler

DNA Dizi Analizi

Mikobakteri türlerinin tanımlanmasında DNA dizi analizi altın standarttır ve aynı zamanda suşların ilişkileri hakkında filogenetik bilgi sağlamaktadır. DNA dizi analizi sık karşılaşılan ve yeni belirlenen HÜM türlerinin ayırımında oldukça kullanışlıdır (14, 47, 88).

Dizi analizi değerlendirilmesi yapılırken elde edilen sonuçları bilgisayar ortamında karşılaştırmak için standart diziler gerekmektedir. Dizi analizi yöntemlerinde güncel ve doğruluğu yüksek veri tabanlarına ihtiyaç duyulmaktadır (14, 47).

Ters hibridizasyon yöntemleri

Ters hibridizasyon yöntemi, kültür izolatından amplifiye edilmiş biyotinle işaretli PZT ürünlerinin, nitrosellüloz şeritler üzerine bağlanmış özgün DNA problemleri ile hibridize edilmesi temeline dayanır (76).

INNO-LiPA Mycobacteria v2 testi (Innogenetics, Belgium), 16S-23S rRNA genleri arasında ‘*spacer region*’ bölgesini hedef alan bir test olup 16 farklı mikobakteri türü (MTK, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. chelonae* kompleks, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. fortuitum* kompleks ve *M. smegmatis*) tanımlanabilmektedir. Tek bir test ile çok çeşitli türlerin tanımlanmasına izin vermesi sistemin en büyük avantajıdır. *M. fortuitum* grup ile *M. thermoresistibile*, *M. agri* ve *M. alvei* gibi nadir karşılaşılan türler arasında çapraz reaktivite saptanabilmesi ise sistemin temel kısıtlılığıdır. Ayrıca yakın ilişkili türler olan *M. chelonae* ve *M. abscessus* türlerini ayırt etmede yetersiz kalmaktadır (14, 89).

GenoType Mycobacterium testinde ise hedef bölge, 23S rRNA genidir. CM (*common mycobacteria* – sık görülen mikobakteriler) ve AS (*additional species* – ek türler) adlı iki kitten oluşan bu testte; CM kiti ile MTK dahil olmak üzere sıklıkla karşılaşılan 15 mikobakteri türü tanımlanmakta, AS kitiyle ise daha az karşılaşılan 16 ek TDM türü ayırt edilmektedir. Genotype Mycobacterium CM/AS kiti ile; *M. avium subspecies*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *Mycobacterium interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*-*M. ulcerans*, *M. peregrinum*, MTK, *M. xenopi*, *M. simiae*, *Mycobacterium mucogenicum*, *M. goodii*, *Mycobacterium cellatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *Mycobacterium heckeshornense*, *M. szulgai*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium hemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *Mycobacterium asiaticum* ve *Mycobacterium shimoidei* tanımlanabilmektedir (90, 91).

Ters hibridizasyon testleri - “*Line Probe Assay*” (LPA) hızlı, uygulaması ve değerlendirmesi kolay, ancak ekipman gerektiren ve maliyeti yüksek testlerdir (76).

PZT- PRA

HÜM türlerinin tanımlanmasında *hsp65* bölgesinin PRA ile incelenmesi değerli bir araçtır (14, 47).

Üreme hızı ve nutrisyonel gereksinimlere dayanmayan bir yöntem olması, göreceli olarak ekipman maliyetinin uygunluğu ve testin bir gün içinde tamamlanabilmesi PRA’nın önemli avantajlarıdır. Piyasada mevcut ticari yöntem olmaması, yöntemin görece olarak kompleks olması ve deneyim gerektirmesi ise dezavantajlarıdır (14, 76).

4.8.2.5.4. Matriks-Destekli Lazer Deiyonizasyon – Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi – ‘*Matrix-assisted Laser Deionization–Time of Flight Mass Spectrometry*’ (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS ile lipid ve ribozomal proteinlerin analizi HÜM’ler de dahil olmak üzere TDM’lerin tanımlanmasında kullanılan güncel yöntemlerden biridir. Başlangıçta MALDI-TOF MS cihaz masrafı yüksek olsa da daha sonra test başına ücreti daha uygun olan bu yöntemin, görece çalışması kolay olup doğru ve hızlı sonuç vermektedir. Birçok TDM türü başarıyla tanımlanabilmekteyken, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* ve *M. abscessus* subsp. *bolletii* gibi bazı klinik olarak önemli HÜM tür ve alt türlerini MALDI-TOF MS ile ayırt etmek zordur. Bu türlerin filogenetik olarak yakın ilişkili olması ve tek-gen dizi analizi ile de ayırt edilememesinden dolayı bu durum beklenen bir problemdir. Ayrıca, *M. chelonae* ile *Mycobacterium immunogenum* ayrımında da bazı sorunlarla karşılaşılmaktadır. MALDI-TOF MS, HÜM türlerinin tanımlanmasında değerli olsa da veri tabanı kısıtlılıkları ve filogenetik olarak yakın ilişkili türlerin ayrımında karşılaşılan zorlukların üzerinde çalışılması gerekmektedir (14, 47).

4.8.2.6. HÜM’lerde Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Otuzun üzerinde HÜM türü tanımlanmış olmakla birlikte travma ile olası su ve toprak maruziyeti sonrası gelişen deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sorumlu tutulan en sık HÜM türleri *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. chelonae* ve *M. fortuitum* gruptur. HÜM türleri birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlı olmadıkları için tedavi seçimleri in-vitro duyarlılık paternlerine dayanmaktadır. HÜM türleri için ADT’de altın standart yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemi olup, CLSI tarafından yapılan öneriler genel olarak *M. fortuitum* grup (*M. fortuitum*, *M. peregrinum* ve önceden *M. fortuitum* üçüncü biyovaryant kompleks’e dahil olan türler), *M. chelonae* ve *M. abscessus* türlerini içeren çalışmaları temel almaktadır. Bununla beraber bu öneriler diğer klinik olarak anlamlı HÜM türleri için de geçerlidir. Duyarlılık testi için çalışılması önerilen antibiyotikler; amikasin, sefoksitin, imipenem, moksifloksasin, sulfametoksazol veya trimetoprim-sulfametoksazol, klaritromisin, siprofloksasin, doksisisiklin/minosiklin, linezolid ve tobramisindir. Bazı ilaçların (tobramisin ve imipenem) duyarlılık test sonuçları belirli türlerle ilgili olduğu için tür düzeyinde tanımlama yapılması veya en azından *M. fortuitum* grup ile *M. chelonae-abscessus* grup ayrımının yapılması önerilmektedir. Duyarlılık testi yapılması, klinik olarak anlamlı kabul

edilen (örneğin kan, doku ile deri ve yumuşak doku lezyonlarından izole edilenler) herhangi bir HÜM türü için endikasyon dahilindedir. Bu organizmalar (özellikle *M. abscessus*) akciğer hastalığına sebep olabildiği gibi geçici olarak solunum yolunda kolonize de olabilirler. Bu nedenle, balgam veya diğer solunum yolu örneklerinden izole edilen tüm HÜM türleri klinik olarak anlamlı olmayabilir. Eğer altı aylık uygun tedavi sonrasında kültür pozitifliği (solunum yolu hariç herhangi bir bölgede) devam ederse, duyarlılık testi tekrarlanmalı ve tanımlama testi doğrulanmalıdır (12, 14, 47).

4.9. HÜM Türleri ve Özellikleri

Mycobacterium cinsine ait yeni tanınan birçok tür HÜM grubuna dahil olmaktadır. HÜM'ler şimdiye kadar tanınan/onaylanmış mikobakteriyel türlerin yaklaşık yarısını oluştururlar. HÜM'ler sadece birçok türü temsil etmekle kalmaz, aynı zamanda çok sayıda çevresel rezervuarda bulunup, insan konakçısındaki bir dizi hastalık belirtisinden sorumlu olurlar. ADT profillerinin değişkenlik göstermesi de HÜM'lerin bir başka önemli özelliğidir (92). HÜM'ler, klinik laboratuvarlarda yaygın olarak izole edilir ve önemli lokal ve yaygın hastalıkların nedeni olabilir (92).

Klinik öneme sahip bazı HÜM'ler;

i. *M. abscessus* ve alt türleri

Tüm genom dizileme verileri *M. abscessus* kompleksine ait üç alt türün varlığını göstermektedir; *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* ve *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Kromojen olmayan hızlı üreyen bir mikobakteri olan *M. abscessus*, en patojenik ve tedaviye dirençli olan HÜM olup çevresel kaynaklardan izole edilebilmektedir (92).

İnsanda yaptığı hastalıklar arasında akciğer enfeksiyonları ve genellikle travma, cerrahi veya enjeksiyon sonrası gelişen deri, yumuşak doku ve kemik enfeksiyonları bulunur. *M. abscessus*, MAK'dan sonra solunum yolundan sıklıkla izole edilen bir TDM türüdür ve hızlı üreyen mikobakteriyel solunum yolu enfeksiyonlarının %80'inden fazlasını oluşturur. *M. abscessus* akciğer enfeksiyonları ile ilişkili başlıca predispozan koşullar; retikülonodüler akciğer infiltrasyonu ile birlikte görülen bronşektazi ve KF'dir. Bu predispozan faktörlere sahip hastalar genellikle 40 yaşın altındadır. Ancak *M. abscessus*'a

bağlı akciğer hastalığı olan hastalar genellikle herhangi bir predispozan faktörü olmayan, 60 yaşından büyük, sigara içmeyen kadınlardır (2).

ii. *M. chelonae* kompleks

M. chelonae kompleks, *M. chelonae* ve üç ek doğrulanmış türden (*Mycobacterium franklinii*, *M. immunogenum* ve *Mycobacterium salmoniphilum*) oluşur. Fırsatçı patojen olan *M. chelonae* musluk suyu, tatlı su ve deniz suyu gibi ortamlardan yaygın olarak saptanabilen, kromojen olmayan, hızlı üreyen bir mikobakteridir (92). En sık görülen klinik durumlar genellikle enfekte pirsing yaraları, kontamine dövme mürekkepleri, plastik cerrahi veya yağ aldırma ile ilişkili deri, yumuşak doku ve kemik enfeksiyonlarıdır. Yaygın hastalıklar özellikle yüksek doz steroid alan immünsüprese bireylerde tanımlanmıştır. Enfeksiyonlar ayrıca oftalmik cerrahi veya kontakt lens kullanımı (keratit) ile ilişkili olabilir (2).

iii. *M. fortuitum* kompleks

M. fortuitum çevresel, kromojen olmayan ve hızlı üreyen bir mikobakteridir. *M. fortuitum* kompleks; *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium setense*, *Mycobacterium septicum*, *M. porcinum*, *Mycobacterium houstonense*, *Mycobacterium boenickei*, *Mycobacterium brisbanense* ve *Mycobacterium neworleansense* türlerini içerir (92).

M. fortuitum sıklıkla deri, yumuşak doku ve kemik enfeksiyonları ile ilişkili olup; lipoid pnömoni, gastroözofageal bozukluklar veya yaygın hastalıklar haricinde nadiren akciğer hastalığına neden olur. *M. fortuitum*'a bağlı akciğer hastalığı klinik olarak *M. abscessus*'un neden olduğu akciğer hastalığına benzerdir (2). Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, mammoplasti ve benzeri plastik cerrahi müdahaleleri veya kalp cerrahisi (sternal yara enfeksiyonları) sonrası sık görülür (92). Pedikür salonlarındaki ayak banyoları da *M. fortuitum* ile ilişkili furonküloz kaynağı olarak tanımlanmıştır (2).

4.10. HÜM'lerde Test Edilecek Öncelikli Antibiyotikler

CLSI M24-A2 kılavuzunda HÜM'lerde test edilmesi gereken antibiyotikler amikasin, sefoksitin, siprofloksasin, klaritromisin, doksisisiklin (veya minosiklin), imipenem, linezolid, moksifloksasin, trimetoprim-sulfametoksazol ve tobramisin olarak verilmiştir (12).

4.10.1. Amikasin

Aminoglikozid grubunda yer alan amikasin, *Streptomyces* türlerinden elde edilen kanamisinin semisentetik derivativesidir. Aminoglikozidler 30S ribozomal alt üniteye geri dönüşümsüz olarak bağlanarak bakteride protein sentezini inhibe eden bakterisidal ajanlardır. Azalmış dış membran permeabilitesi, transportun azalması veya aktif eflüks ile ilacın hücre içine alınımında azalma, 16S rRNA veya ribozomal proteinlerde mutasyon ya da 16S rRNA'nın posttranskripsiyonel metilasyonu nedeniyle ilacın hedefinde değişiklik ve ilacın enzimatik modifikasyonu bakterilerde aminoglikozid direncine yol açan temel mekanizmalardır (14).

4.10.2. Sefoksitin

Sefalosporin grubunda yer almaktadır. Sefalosporinler, *Cephalosporium acremonium*'un fermantasyon ürünlerden elde edilen antibiyotikler olup, dihidrotiyazin halkasına bağlı beta laktam halkası bulunduran 7-aminosefalosporanik asit içermektedir. Penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanıp bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan sentezini engelleyerek bakterisidal aktivite gösterirler (14).

4.10.3. Siprofloksasin

Florokinolon grubunda yer almaktadır. Florokinolonlar çekirdeğinde florin atomu içeren nalidiksik asitle biyokimyasal olarak ilişkili antibiyotiklerdir. Florokinolonların temel hedefi DNA replikasyon, rekombinasyon ve tamirinde görev alan DNA topoizomeraz II (DNA giraz) enzimi olup ayrıca DNA topoizomeraz IV enzimini de inhibe etmektedirler. DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini kodlayan yapısal genlerde (*gyrA*, *gyrB*, *parC* ve *parE*) kromozomal mutasyonlar, dış membran permeabilitesini düzenleyen genlerde mutasyonlar, enerji-bağımlı eflüks pompalarının salınımı/aşırı salınımı ve kinolonların DNA giraz ile topoizomeraz IV'e bağlanmasını engelleyen plazmid aracılı direnç genlerinin (*qnrA*, *qnrB* ve *qnrS*) kazanımı sebebiyle kinolon direnci gelişebilmektedir (14).

4.10.4. Klaritromisin

Makrolid grubunda yer almaktadır. Kimyasal yapıları desozamin ve kladinoz moleküllerine bağlı makrosiklik lakton halkası içermektedir. Makrolidler, 50S ribozomal alt ünitenin 23S rRNA birimine geri dönüşümlü olarak bağlanarak translokasyonu engelleme yoluyla protein sentezinin inhibe ederek bakteriyostatik aktivite sergilerler. Klaritromisin,

atipik mikobakterilerin tedavisinde altın standart ajan olarak değerlendirilmektedir. Makrolid direncinin temel mekanizması; ilacın bakteriyel hedefi olan 23S rRNA bağlanma bölgesini modifiye eden rRNA metiltransferaz enzimini kodlayan *erm* geninin varlığıdır. Bu gen yapısal veya indüklenebilir olabilir. Bazı HÜM türleri (*M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. abscessus* subsp. *abscessus* suşlarının yaklaşık %80'i gibi) indüklenebilir klaritromisin (makrolid) direncine yol açan indüklenebilir *erm* geni içermektedirler ve üç günlük inkübasyon süresi sonunda duyarlı olmakla birlikte 14 günlük inkübasyonda direnç gösterebilmektedirler. Bu nedenle bu ilaçlar tek başına tercih edilmemeli, her zaman kombinasyon tedavisinde verilmelidir. Fonksiyonel *erm* geni olmayan (*M. chelonae*, *M. mucogenicum* kompleks, *M. peregrinum*, *M. senegalense*, *M. immunogenum* ve *M. abscessus* subsp. *massiliense*) türlerde ise uzamış inkübasyonda klaritromisin MİK değerlerinde ya çok az değişiklik olmakta ya da hiçbir değişiklik olmamaktadır (14, 47, 92, 93).

4.10.5. Doksisisiklin

Tekrasiklin grubu bir antibiyotik olup, yapısında dört halkalı *hidronaftasen* çekirdeği bulunmaktadır. Enerji bağımlı bir süreçle bakteri içine girdikten sonra 30S ribozomal alt üniteye bağlanıp aminoaçil-tRNA'nın RNA-ribozom kompleksinde akseptör A bölgesine tutunmasını engelleyerek protein sentezini inhibe eden bakteriyostatik ajanlardır. Tetrasiklin direnci büyük oranda aktif eflüks nedeniyle gerçekleşmektedir (14).

4.10.6. Minosiklin

Tekrasiklin grubu bir antibiyotik olup, aynı gruptaki doksisisiklin ile benzer etki mekanizmasına sahiptir. CLSI tarafından doksisisiklin veya minosiklinden biri seçilerek çalışılabileceği belirtilmiştir (12, 14).

4.10.7. İmipenem

Karbapenem grubu bir antibiyotiktir. Karbapenemler beta laktam grubu içerisinde en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Özellikle PBP2'ye yüksek afinite ile olmak üzere PBP'ye bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe etmektedirler. İmipenem, renal proksimal tübül hücrelerinin fırçamsı kenarlarında bulunan dehidropeptidaz I enzimi ile metabolize ve inaktive edilmektedir. Serum ve idrarda yeterli konsantrasyona erişmek için, imipenem dehidropeptidaz inhibitörü olan silastatin ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Silastatin

antibakteriyel aktiviteye sahip değildir. *Actinomyces*, *Nocardia* ve atipik mikobakterilere karşı karbapenemler arasında imipenem önemli ölçüde aktiviteye sahiptir (14, 47, 93).

4.10.8. Linezolid

Oksazolidinon grubu sentetik bir antibiyotiktir. Linezolid, 50S ribozomal alt ünitenin 23S rRNA biriminin V bölgesine bağlanarak, tRNA^{fMet} bağlanma bölgesini bozmakta ve 70S inisiyasyon kompleksini inhibe ederek mRNA translasyonunun başlamasına engel olmaktadır. Bu antimikrobiallerle ribozomal protein sentezini inhibe eden diğer antibiyotikler arasında çapraz direnç gelişimi gözlenmemektedir (14).

4.10.9. Moksifloksasin

Florokinolon grubu bir antibiyotik olup, DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV enzimlerine etki ile DNA sentezini inhibe ederek bakterisidal aktivite göstermektedir. Moksifloksasin, *M. tuberculosis*, MAK, *M. fortuitum* grup, *M. chelonae*, *M. kansasii* ve *M. xenopi* gibi mikobakterilere karşı in-vitro aktivite göstermektedir (14, 47, 93).

4.10.10. Trimetoprim-Sulfametoksazol

Trimetoprim ve sülfanomid grubu bir antibiyotik olan sulfametoksazol bakteriyel folik asit metabolizması yolunu farklı alanlarda bloke ederler, antibakteriyel aktiviteyi artırır ve çok sayıda farklı mikroorganizmaya karşı sinerjistik etki gösterirler. Trimetoprim primidin analogu olup bakteriyel dihidrofolat redüktaz enzimini, sulfametoksazol ise dihidrofolat enzimini inhibe eder. Folat metabolizmasındaki bu ardışık inhibisyon sonucunda bakteriyel DNA sentezi engellenir. Trimetoprim-sulfametoksazol ko-trimaksazol olarak da isimlendirilir ve çoğu enfeksiyonun tedavisinde çok etkilidir (14).

4.10.11. Tobramisin

Streptomyces türlerinden derive edilen tobramisin, aminoglikozid grubunda yer almaktadır. 30S ribozomal alt üniteye geri dönüşümsüz olarak bağlanıp protein sentezini inhibe ederek bakterisidal etki göstermektedir (14).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Çalışmaya Alınan HÜM Suşları

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına 2013-2018 yılları arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve GenoType Mycobacterium CM (Hain Lifescience, Almanya) ticari kiti ile tür tayini yapıp stoklanan 62 adet HÜM izolatu çalışmaya alındı. Hastaların ardışık örneklerinden izole edilen aynı etkenler çalışma dışı bırakıldı.

5.2. HÜM'lerin Üretilmesi

2013-2018 yılları arasında, Mikobakteriyoloji Laboratuvarında HÜM olarak tanımlanmış izolatlara ait MGIT besiyerlerinden 0.5 mL alınıp, LJ besiyerine (Becton Dickinson, ABD) pasaj yapıldı. MGIT besiyeri stoğu mevcut değilse veya MGIT besiyerinden yapılan pasaj sonucu üreme olmamışsa izolatlardan stok LJ besiyerlerinden alınan koloniler 0.5 mL steril distile su içerisinde süspansiyon edilerek yeni LJ besiyerlerine pasaj yapıldı. LJ besiyerinde canlandırılmayan bazı izolatlara ise MGIT besiyerine (Becton Dickinson, ABD) pasajlanarak BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) sistemi ile üretildikten sonra LJ besiyerlerine pasaj yapıldı. MGIT besiyerine pasaj sonrasında da üreme gözlenmeyen örnekler için izolatlardan çalışma dışı bırakıldı.

Bütün işlemler biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. Pasaj yapılan LJ besiyerleri 37°C'de inkübe edildi ve üremeler kontrol edilerek, üreme zamanları not edildi.

5.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, antimikrobiyal duyarlılığın araştırılmasında altın standart olarak kabul edilmektedir (12). Çalışmaya dahil edilen HÜM'lerin amikasin, tobramisin, sefoksitin, imipenem, siprofloksasin, moksifloksasin doksisisiklin, linezolid ve klaritromisine duyarlılıklarının araştırılması için sıvı mikrodilüsyon yöntemi CLSI M07-A8 ve CLSI M24-A2 standartlarına uygun olarak çalışıldı (12, 94).

i. Katyon Ayarlı Mueller Hinton Sıvı Besiyerlerinin (KAMHB) Hazırlanması

KAMHB (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD) üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlandı. Toz halinde bulunan KAMHB'den 5.5 gr tartılarak 250 mL distile su içinde

çözündürüldü ve ardından otoklavda 115-121°C'de 10 dakika steril edilerek kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan besiyeri kullanım öncesi 4°C'de saklandı.

ii. Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması

Toz formda temin edilen tüm antibiyotikler Sigma-Aldrich Co'dan (St Louis, MO, ABD) satın alındı. Amikasin disülfat, sefoksitin sodyum, siprofloksasin HCl, doksisiklin hiklat, moksifloksasin hidroklorit ve tobramisin çözücü ve sulandırıcı olarak distile su içerisinde; linezolid çözücü olarak dimetil sülfoksit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD), sulandırıcı olarak distile su içerisinde; klaritromisin çözücü olarak aseton (Merck, Darmstad, Almanya), sulandırıcı olarak fosfat tamponu (pH: 6.5, 0.1 mol/L) içerisinde ve imipenem çözücü ve sulandırıcı olarak fosfat tamponu (pH: 7.2, 0.01 mol/L) içerisinde süspansiyon edilerek üreticinin önerileri doğrultusunda stok solüsyonları hazırlandı.

Tüm stok solüsyon konsantrasyonları 10 mg/mL olarak ayarlandı. Şırınga filtre ile sterilizasyon sonrası ependorf tüplere alikotlanarak -20°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

iii. Sıvı Mikrodilüsyon Yönteminin Uygulanışı

Her HÜM izolatı için bir adet 96 kuyucuklu U tabanlı mikrodilüsyon plağında klaritromisin haricindeki sekiz antibiyotik çalışıldı. Klaritromisin değerlendirmesi inkübasyonun 14. gününe kadar sürdürüleceği için her çalışmada HÜM izolatları gruplanarak klaritromisin için ayrı bir mikrodilüsyon plağında çalışıldı.

Üretici talimatlarına göre hazırlanıp 4°C'de saklanan KAMHB oda sıcaklığına getirilerek mikrodilüsyon plaklarının tüm kuyucuklarına 100 µL eklendi.

Çalışma günlerinde her antibiyotik için oda sıcaklığına getirilmiş 10 mg/mL konsantrasyonundaki stok solüsyondan 256 µL alınıp, KAMHB ile 5 mL'ye tamamlanarak 512 µg/mL konsantrasyonunda antibiyotik süspansiyonu hazırlandı.

Mikrodilüsyon plağındaki her sıranın üçüncü kuyucuğuna hazırlanan 512 µg/mL yoğunluğundaki antibiyotik süspansiyonundan 100 µL eklendi ve kuyucuktaki son antibiyotik konsantrasyonu 256 µg/mL olarak elde edildi. Üçüncü kuyucuktan 100 µL alınıp 12. kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapıldı, son kuyucukta 100 µL dışarı atıldı. Her antibiyotik için en yüksek 256 µg/mL, en düşük 0.5 µg/mL konsantrasyonun olduğu iki kat dilüsyonlar oluşturuldu.

Steril serum fizyolojik içerisinde her HÜM izolatu için dansitometre yardımı ile 0.5 Mc Farland standart bulanığında süspansiyon hazırlandı. Hazırlanan süspansiyon steril serum fizyolojik ile 1:10 dilüe edildikten sonra önceden KAMHB ve her sırasında seri sulandırım halinde antimikrobik ilaç (amikasin, tobramisin, sefoksitin, imipenem, siprofloksasin, moksifloksasin doksisisiklin, linezolid ve klaritromisin) ilave edilmiş mikrodilüsyon plaklarının her antibiyotik için sterilit kontrol (negatif) kuyucuğu olan ilk kuyucuk hariç diğer tüm kuyucuklarına 15 dakika içinde 5 µL inoküle edildi.

Mikrodilüsyon plağının her sırasının ilk kuyucuğuna sadece besiyeri konularak negatif kontrol kuyucuğu; ikinci kuyucuğuna ise antibiyotik konulmayıp, sadece besiyeri ve bakteri süspansiyonu konularak üreme (pozitif) kontrol kuyucuğu hazırlandı.

iv. Kalite Kontrol Suşları

Antimikrobiyal ajanların konsantrasyonunu doğrulama ve test performansını değerlendirmek için HÜM türlerinin sıvı mikrodilüsyon testinde kalite kontrol suşu olarak *M. peregrinum* ATCC 700686 kullanılması önerilmektedir. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 17853 ve/veya *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ise kabul edilebilir diğer alternatiflerdir (12). Bu amaçla *S. aureus* ATCC® 29213, *P. aeruginosa* ATCC® 27853 ve *E. faecalis* ATCC® 29212 kökenleri her çalışmada CLSI tarafında önerilen antibiyotikler için uygun dilüsyon aralıklarında çalışıldı.

v. İnkübasyon

Sıvı mikrodilüsyon testinde, inokulum eklendikten sonra her mikrodilüsyon plağı, kurumayı önlemek amacıyla kapakla kapatılıp, 28-30°C'de 72 saat inkübe edildi. Yetmiş iki saatten sonra üreme kontrol kuyucuğunda üreme yeterli ise (2+ veya kesin bulanıklık ve küme şeklinde üreme) MİK değeri kaydedildi. Yeterli değilse tekrar inkübasyona devam edilip dördüncü günde tekrar değerlendirildi. Üreme yeterli olmazsa inkübasyon beşinci güne uzatılıp klaritromisin hariç tüm ilaçlar için son değerlendirme yapıldı. Klaritromisin duyarlılığını değerlendirmek için inkübasyon 14. güne kadar devam ettirildi (12). İnkübasyon devam ederken besiyerinde kuruma saptanması durumunda, ilgili izolat için kuruma gözlenen antibiyotik değerlendirmeden çıkarıldı.

vi. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

MİK, mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremeyi tamamen inhibe eden ve çıplak gözle belirlenebilen en düşük antimikrobik ilaç konsantrasyonudur (Şekil 3, Şekil 4) (94).

MİK belirlenirken antibiyotik içeren kuyucuklardaki üreme yoğunluğu her test setinde kullanılan üreme kontrol kuyucuklarındaki üreme yoğunluğu ile kıyaslandı (94). Yapılan testlerin geçerli olabilmesi için test edilen kalite kontrol suşlarının MİK değerlerinin beklenen aralıkta olması, her antibiyotik için sterilite kontrol kuyucuğunda üreme olmaması ve üreme kontrol kuyucuğunda kabul edilebilir üreme olması gerekmektedir; bu koşulların sağlanamadığı durumlarda test tekrar edildi (94). Beşinci günde üreme kontrol kuyucuğunda yeterli üreme gözlenemediği durumlarda izolatlar çalışma dışı bırakıldı.

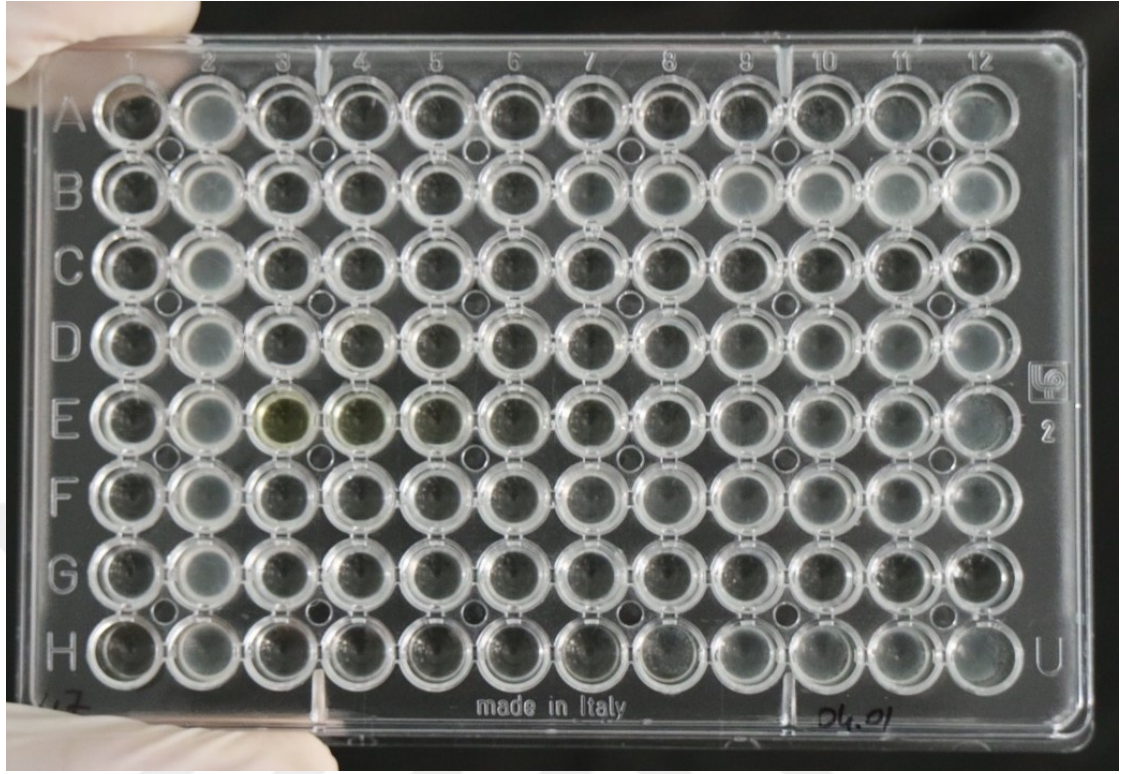
Klaritromisin için yapılan 14. gün değerlendirilmesi indüklenbilir makrolid direncini saptamak için önerilmekte, ancak klaritromisin direncinin (MİK ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$) önceki değerlendirmelerde tesbiti durumunda test erken sonlandırılabilir (12). Çalışmada klaritromisin duyarlılık sonuçları üçüncü günde kaydedildi, yedinci ve 10. günlerde tekrar değerlendirildi, bu değerlendirmede eğer izolat duyarlı ise 14. günde tekrar değerlendirildi.

Sıvı mikrodilüsyon testinde her bir antibiyotik için kuyucuklar arasında üreme olmamış tek bir kuyucuk görüldüğünde en yüksek MİK değeri okundu (94).

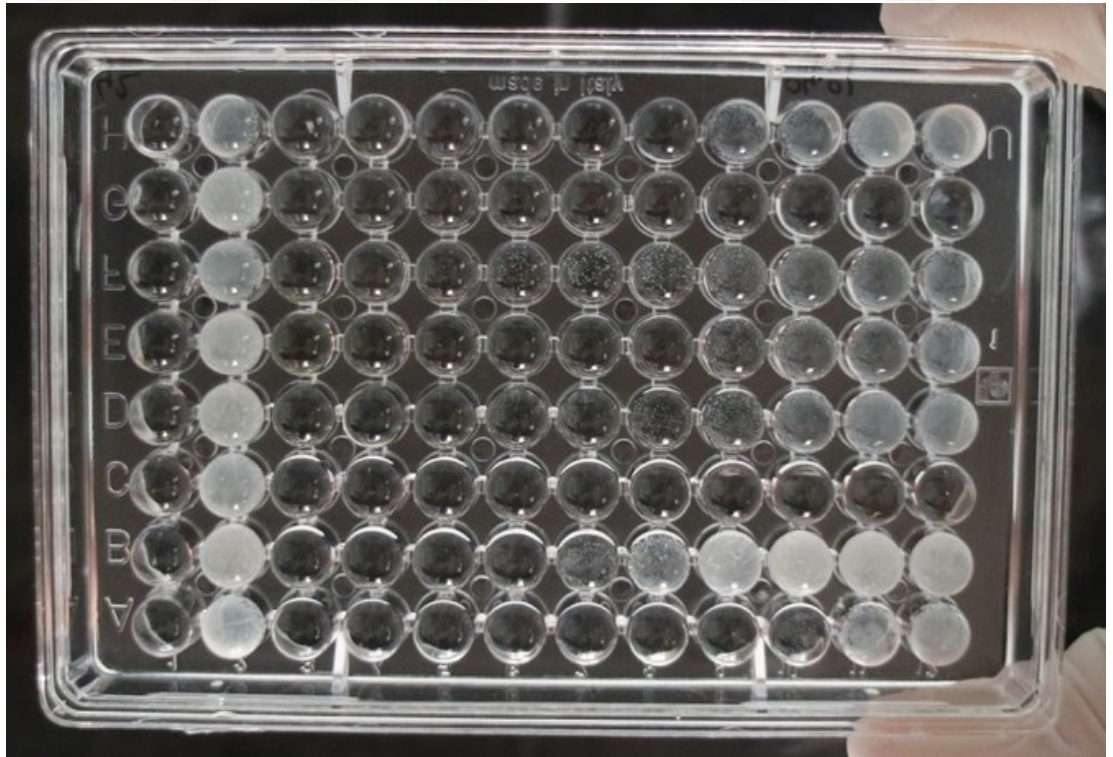
MİK okumaları iki araştırmacı tarafından bağımsız olarak yapıldı. Tüm izolatlar için MİK değerleri ve yorumlama CLSI standartlarında yer alan klinik sınır değerlere (Tablo 6, Tablo 7) uygun olarak duyarlı, orta duyarlı veya dirençli olarak belirlendi (12).

CLSI önerileri doğrultusunda amikasin MİK değeri ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ saptanan *M. abscessus* izolatları ve imipenem MİK değeri > 8 $\mu\text{g/mL}$ saptanan *M. fortuitum* izolatları tekrar test edildi (12).

Şekil 3. Sıvı mikrodilüsyon plağının üstten görünümü.



Şekil 4. Sıvı mikrodilüsyon plağının alttan görünümü.



Tablo 6. HÜM'ler test edildiğinde *S. aureus* ATCC® 29213, *P. aeruginosa* ATCC® 27853 ve *E. faecalis* ATCC® 29212 için MİK değerlerinin (µg/mL) kalite kontrol aralıkları (12).

Antimikrobiyal Ajan	<i>S. aureus</i> ATCC® 29213 MİK aralığı (µg/mL)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 MİK aralığı (µg/mL)	<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212 MİK aralığı (µg/mL)
Amikasin	1–4	1–4	64–256
Sefoksitin	1–4	– ^a	– ^a
Siprofloksasin	0.12–0.5	0.25–1	0.25–2
Klaritromisin	0.12–0.5	– ^a	– ^a
Doksisiklin	0.12–0.5	– ^a	2–8
İmipenem	0.015–0.06	1–4	0.5–2
Linezolid	1–4	– ^a	1–4
Moksifloksasin	4–16	1–8	0.06–0.5
Tobramisin	0.12–1	0.25–1	8–32

a: Çizgi, mevcut önerilen yöntemlerle hiçbir çalışma yapılmadığını göstermektedir.

Tablo 7. HÜM'ler için sıvı mikrodilüsyon değerlendirme kriterleri (12).

Antimikrobiyal Ajan	Kategori için MİK değeri (µg/mL)		
	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Amikasin	≤16	32	≥64
Sefoksitin	≤16	32-64	≥128
Siprofloksasin	≤1	2	≥4
Klaritromisin	≤2	4	≥8
Doksisiklin	≤1	2-4	≥8
İmipenem	≤4	8-16	≥32
Linezolid	≤8	16	≥32
Moksifloksasin	≤1	2	≥4
Tobramisin	≤2	4	≥8

6. BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına 2013-2018 yılları arasında gönderilen örneklerden soyutlanan 62 adet HÜM izolatu çalışmaya alındı. Biri *M. abscessus*, biri *M. fortuitum* olmak üzere iki izolat MGIT besiyerinden yeni LJ ve MGIT besiyerlerine yapılan pasajlarında üreme saptanmadığı, iki *M. abscessus* izolatu da sıvı mikrodilüsyon testinin 5. gününde üreme kontrol kuyucukları dahil olmak üzere hiçbir kuyucukta üreme gözlenmediği için çalışma dışı bırakıldı. Çalışma sonunda 56 hastaya ait 58 HÜM izolat sonucu değerlendirmeye alındı. Aynı hastaya ait farklı yıllarda gönderilmiş lenf nodu örneğinden izole edilen bir *M. fortuitum* ve doku örneğinden izole edilen bir *M. abscessus* izolatu ile bir diğer hastaya ait farklı yıllarda gönderilen balgam örneklerinden izole edilen iki *M. abscessus* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir.

Değerlendirilen 58 izolatu 35'i (%60.3) *M. fortuitum*, 19'u (%32.8) *M. abscessus*, dördü (%6.9) *M. chelonae* idi. İzolatların örnek grubu ve türlere göre dağılımı Tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 8. İzolatların örnek grubu ve türlere göre dağılımı.

Örnek Grubu	HÜM Türleri			Toplam n (%)
	<i>M. abscessus</i> n (%)	<i>M. fortuitum</i> n (%)	<i>M. chelonae</i> n (%)	
Bronş Lavaj	2	27	2	31 (53.4)
Balgam	13	2	1	16 (27.6)
Bronko Alveolar Lavaj	1	5	1	7 (12.1)
Lenf Nodu	1	1	0	2 (3.5)
Trakeal Sekret	1	0	0	1 (1.7)
Doku	1	0	0	1 (1.7)
Toplam	19 (32.8)	35 (60.3)	4 (6.9)	58 (100)

İzolatların tekrarlanan testler sonucunda elde edilen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 9'de, MİK değerleri Tablo 10'da gösterilmektedir.

***M. abscessus* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon test sonuçları:**

Değerlendirmeler çalışmaya dahil edilen 19 *M. abscessus* izolatu sonucuna göre yapıldı. Amikasin MİK değeri 64 µg/mL saptanan ve dirençli kategoride bulunan dört *M. abscessus* izolatu CLSI önerileri doğrultusunda tekrar test edildi (12). Tekrarlanan testlerde amikasin MİK değeri iki izolat için 64 µg/mL (dirençli), iki izolat için 32 µg/mL (orta duyarlı) saptandı. Tekrarlanan amikasin test sonuçlarına göre 19 izolattan; 14'ü (%73.68) duyarlı, üçü (%15.73) orta duyarlı, ikisi (%10.53) dirençli bulundu.

On dokuz *M. abscessus* izolatından sadece biri (%5.26) doksisisiklin duyarlı bulundu (MİK ≤ 0.5 µg/mL). İmipenem değerlendirmesinde dört (%21.05) izolat duyarlı, 15 (%78.95) izolat orta duyarlı bulundu, imipenem direncine ise rastlanmadı. Klaritromisin değerlendirmesinde üçüncü günde 14 (%73.68) izolat duyarlı gözlenirken, 14. güne gelindiğinde dört (%21.05) izolat duyarlı saptandı.

***M. chelonae* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon test sonuçları:**

Çalışmaya dahil edilen *M. chelonae* izolatlarının tümü (n=4) test edilen aminoglikozidler olan amikasin ve tobramisine duyarlı bulundu. Tüm izolatların hem üçüncü hem de 14. gün klaritromisin değerlendirmelerinde MİK değerleri ≤ 0.5 µg/mL olarak duyarlı bulundu. Dört izolat içerisinde sefoksitine duyarlı sonuç görülmedi.

***M. fortuitum* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon test sonuçları:**

Klaritromisin hariç, değerlendirmeler çalışmaya dahil edilen 35 *M. fortuitum* izolatu sonucuna göre yapıldı. Klaritromisin çalışılan bir plakta inkübasyon devam ederken besiyeri kuruması saptanması üzerine bir izolatu test sonucu belirlenemedi. İzolat yeterli malzeme bulunmaması nedeni ile tekrar test edilemedi ve klaritromisin değerlendirmesi 34 *M. fortuitum* izolatu sonucuna göre yapıldı. İzolatların tümü amikasin, siprofloksasin ve moksifloksasine duyarlı bulundu.

İmipenem MİK değeri 16 µg/mL saptanan ve orta duyarlı kategoride bulunan bir *M. fortuitum* izolatu CLSI önerileri doğrultusunda tekrar test edildi (12). Tekrarlanan imipenem MİK değeri 8 µg/mL (orta duyarlı) saptandı.

Tablo 9. HÜM izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

HÜM Türleri (izolat sayısı) ve Antimikrobiyal Ajanlar	MİK dağılımı µg/mL	Kategori Dağılımı		
		Duyarlı n (%)	Orta Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)
<i>M. abscessus</i> (19)				
Amikasin*	4 - 64	14 (73.68)	3 (15.79)	2 (10.53)
Sefoksitin	16 - 128	5 (26.31)	3 (15.79)	11 (57.9)
Siprofloksasin	1 - 16	3 (15.79)	3 (15.79)	13 (68.42)
Doksisiklin	≤ 0.5 - >256	1 (5.26)	0	18 (94.74)
İmipenem	2 - 16	4 (21.05)	15 (78.95)	0
Linezolid	2 - 64	4 (21.05)	8 (42.11)	7 (36.84)
Moksifloksasin	≤ 0.5 - 16	3 (15.79)	0	16 (84.21)
Tobramisin	1 - 64	2 (10.53)	0	17 (89.47)
Klaritromisin 3. gün	≤ 0.5 - 16	14 (73.68)	3 (15.79)	2 (10.53)
Klaritromisin 14. gün	≤ 0.5 - >256	4 (21.05)	0	15 (78.95)
<i>M. cheolerae</i> (4)				
Amikasin	≤ 0.5 - 16	4 (100)	0	0
Sefoksitin	32 - >256	0	1 (25)	3 (75)
Siprofloksasin	≤ 0.5 - 8	1 (25)	0	3 (75)
Doksisiklin	≤ 0.5 - 128	1 (25)	0	3 (75)
İmipenem	≤ 0.5 - 16	1 (25)	3 (75)	0
Linezolid	1 - 16	1 (25)	3 (75)	0
Moksifloksasin	≤ 0.5 - 2	2 (50)	2 (50)	0
Tobramisin	≤ 0.5 - 1	4 (100)	0	0
Klaritromisin 3. gün	≤ 0.5	4 (100)	0	0
Klaritromisin 14. gün	≤ 0.5	4 (100)	0	0
<i>M. fortuitum</i> (35)				
Amikasin	≤ 0.5 - 16	35 (100)	0	0
Sefoksitin	4 - 64	7 (20)	28 (80)	0
Siprofloksasin	≤ 0.5 - 1	35 (100)	0	0
Doksisiklin	≤ 0.5 - 64	2 (5.71)	5 (14.29)	28 (80)
İmipenem*	≤ 0.5 - 8	20 (57.14)	15 (42.86)	0
Linezolid	≤ 0.5 - 64	13 (37.14)	12 (34.29)	10 (28.57)
Moksifloksasin	≤ 0.5 - 1	35 (100)	0	0
Tobramisin	2 - 64	1 (2.86)	4 (11.43)	30 (85.71)
Klaritromisin 3. gün**	≤ 0.5 - 16	11 (32.35)	17 (50)	6 (17.65)
Klaritromisin 14. gün**	≤ 0.5 - 64	1 (2.94)		33 (97.06)

* Tekrarlanan test sonuçlarına göre düzenlenmiştir.

** 34 izolat sonucu değerlendirilmiştir.

MİK: Minimal İnhibitör Konsantrasyon (µg/mL)

Tablo 10. HÜM izolatlarının çalışılan antimikrobiyaller için saptanan MİK değerleri.

Antimikrobiyal Ajanlar ve HÜM Türleri (izolat sayısı)	Belirtilen MİK değerleri (µg/mL) için saptanan izolat sayısı (kategori durumu)										
	<=0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
AMİKASİN											
<i>M. abscessus</i> * (19)				2 (S)	6 (S)	6 (S)	3 (I)	2 (R)			
<i>M. chelonae</i> (4)	1 (S)	1 (S)			1 (S)	1 (S)					
<i>M. fortuitum</i> (35)	10 (S)	6 (S)	11 (S)	4 (S)	3 (S)	1 (S)					
SEFOKSİTİN											
<i>M. abscessus</i> (19)						5 (S)	5 (I)	6 (I)	3 (R)		
<i>M. chelonae</i> (4)							1 (I)				3 (R)
<i>M. fortuitum</i> (35)				1 (S)		6 (S)	26 (I)	2 (I)			
SİPROFLOKSASİN											
<i>M. abscessus</i> (19)		3 (S)	3 (I)	3 (R)	8 (R)	2 (R)					
<i>M. chelonae</i> (4)	1 (S)				3 (R)						
<i>M. fortuitum</i> (35)	34 (S)	1 (S)									
DOKSİSİKLIN											
<i>M. abscessus</i> (19)	1 (S)								1 (R)		17 (R)
<i>M. chelonae</i> (4)	1 (S)							1 (R)	2 (R)		
<i>M. fortuitum</i> (35)	2 (S)		1 (I)	4 (I)	10 (R)	12 (R)	5 (R)	1 (R)			
İMİPENEM											
<i>M. abscessus</i> (19)			1 (S)	3 (S)	9 (I)	6 (I)					
<i>M. chelonae</i> (4)	1 (S)					3 (I)					
<i>M. fortuitum</i> * (35)	1 (S)	1 (S)	4 (S)	14 (S)	15 (I)						
LİNEZOLİD											
<i>M. abscessus</i> (19)			1 (S)	2 (S)	1 (S)	8 (I)	3 (R)	4 (R)			
<i>M. chelonae</i> (4)		1 (S)	1 (S)		1 (S)	1 (I)					
<i>M. fortuitum</i> (35)	1 (S)		2 (S)	5 (S)	5 (S)	12 (I)	9 (R)	1 (R)			
MOKSİFLOKSASİN											
<i>M. abscessus</i> (19)	3 (S)			9 (R)	5 (R)	2 (R)					
<i>M. chelonae</i> (4)	2 (S)		2 (I)								
<i>M. fortuitum</i> (35)	34 (S)	1 (S)									
TOBRAMİSİN											
<i>M. abscessus</i> (19)		1 (S)	1 (S)		2 (R)	9 (R)	4 (R)	2 (R)			
<i>M. chelonae</i> (4)	2 (S)	2 (S)									
<i>M. fortuitum</i> (35)			1 (S)	4 (I)	20 (R)	4 (R)	4 (R)	2 (R)			
KLARİTROMİSİN 3. gün											
<i>M. abscessus</i> (19)	8 (S)	3 (S)	3 (S)	3 (I)	1 (R)	1 (R)					
<i>M. chelonae</i> (4)	4 (S)										
<i>M. fortuitum</i> (34)	5 (S)	2 (S)	4 (S)	17 (I)	4 (R)	2 (R)					
KLARİTROMİSİN**											
<i>M. abscessus</i> (19)	1 (S)	2 (S)	1 (S)		4 (R)	4 (R)	3 (R)	1 (R)		2 (R)	1 (R)
<i>M. chelonae</i> (4)	4 (S)										
<i>M. fortuitum</i> (34)	1 (S)				6 (R)	16 (R)	10 (R)	1 (R)			

* Tekrarlanan test sonuçlarına göre düzenlenmiştir.

**Dirençli izolatlarda, değerlendirme boyunca saptanan dirençli kategorideki ilk MİK değeri; duyarlı izolatlarda 14. gün MİK değeri verilmiştir.

S: duyarlı, I: orta duyarlı, R: dirençli

7. TARTIŞMA

HÜM'ler giderek artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak izole edilmektedir. Antimikrobiyal duyarlılık paternleri HÜM türleri arasında açık bir şekilde farklı olduğundan, optimal ve etkili tedavi rejiminin seçilmesinde ADT'lerinin artan önemi olması muhtemeldir. Bu çalışmada üç HÜM türüne ait 58 izolata duyarlılık durumları sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak dokuz antimikrobiyal ajan açısından incelenmiştir.

i. *M. abscessus*:

M. abscessus izolatları standart antitüberküloz ajanlara karşı dirençlidir ve diğer bazı ilaçlara değişken in-vitro duyarlılık göstermektedir. Bu nedenle tüm klinik olarak anlamlı izolatlara ADT yapılması önerilmektedir (2). Küratif tedavide akciğer lokal tutulumlarının cerrahi rezeksiyonu ve/veya makrolidler ve amikasin, sefoksitin veya imipenem ile kombine çoklu ilaç tedavisini gerektirebilir (2, 92). *M. abscessus* için küratif tedavinin amacı 12 aylık kültür negatifliğidir, monoterapi dirence yol açabileceği için tercih edilmemelidir (93).

Bu çalışmada *M. abscessus* izolatlarının duyarlılık oranları; amikasine %73.68 (14/19), sefoksitine %26.31 (5/19), imipeneme %21.05 (4/19), linezolide %21.05 (4/19), moksifloksasine %15.79 (3/19), siprofloksasine %15.79 (3/19), tobramisine %10.53 (2/19), doksisisikline %5.26 (1/19), klaritromisine üçüncü günde %73.68 (14/19) ve 14. günde %21.05 (4/19) olarak saptandı. İmipeneme direnç gözlenmedi.

Amikasin birçok aminoglikozid modifiye eden enzime dirençli olup, çok ilaca dirençli HÜM tedavisinde oldukça önemli bir antibiyotiktir (14, 47). Genel olarak diğer HÜM türlerine nazaran antibiyotiklere daha dirençli olan *M. abscessus* izolatları amikasine duyarlı veya orta duyarlıdır (47). Bu çalışmada da literatür ile uyumlu olarak aktivitesi en yüksek antimikrobiyal, izolatların %73.68'inin (14/19) duyarlı olduğu amikasindi. Bu çalışma ile benzer şekilde amikasine duyarlı izolat oranları Pang ve ark. tarafından %100 (55/55) (6); Park ve ark. tarafından %99 (73/74) (95); Broda ve ark. tarafından KF hasta grubunda %52 (30/58), klinik laboratuvar örneklerinde %56 (67/119) (96) bulunmuş ve bu sonuçlarla *M. abscessus* izolatları için test edilen antibiyotikler arasında amikasinin en yüksek aktivite oranlarından birine sahip olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada *M. abscessus* izolatları için değerlendirilen aminoglikozid grubu antibiyotiklerden; amikasin direnç oranı %10.53 iken, tobramisin direnç oranı %89.47 idi.

Bu çalışma ile benzer şekilde çeşitli çalışmalarda amikasine %0-24.5, tobramisine %60-100 oranları arasında direnç bulunmuş; amikasine düşük direnç gözlenmesine karşılık tobramisine yüksek direnç izlenmiştir (9-11, 97-100).

Bu sonuçlar amikasinin *M. abscessus* enfeksiyonların tedavisinde önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada tobramisine yüksek direnç gösterilmesi, tobramisinin *M. abscessus* tedavisinde yer almaması gerektiğini belirten kılavuzlarla uyum göstermektedir (2, 12).

M. abscessus suşları sefoksitine duyarlı veya kısmen duyarlı olmaktadır (47, 93). Bu çalışmada sefoksitine *M. abscessus* izolatların %26.31'i (5/19) duyarlı, %15.79'u (3/19) orta duyarlı, %57.9'u (11/19) dirençli saptandı.

Bu çalışmanın aksine Da Mata-Jardín ve ark.'nın 63 (101), Çavuşoğlu ve ark.'nın da yedi izolat (9) değerlendirdiği çalışmalarda sefoksitin direnci saptanmamıştır. Park ve ark. tarafından %99 (73/74) duyarlı izolat oranı ile sefoksitin en yüksek aktiviteye sahip ilaçlar arasında bulunmuştur (95). Sefoksitini Pang ve ark. %69.09 (38/55) (6) oranında duyarlı; Tang ve ark. %93 (280/300) (10), Aono ve ark. %75.3 (100), Buchanan ve ark. %67.8 (98), Shen ve ark. %50 (10/20) (97) oranında orta duyarlı bulmuşlardır. Bahsi geçen çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda sefoksitine direnç oranının yüksek, duyarlı izolat oranının ise düşük saptanması *M. abscessus* izole edilen hastalarda, kombine ilaç tedavisinden önce sefoksitin duyarlılık testi çalışılmasının faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Genel olarak diğer HÜM türlerine nazaran antibiyotiklere daha dirençli olan *M. abscessus* izolatları imipeneme duyarlı veya orta duyarlı bulunmaktadır (47). Bu çalışmada da *M. abscessus* izolatların %21.05'i (4/19) imipeneme duyarlı, %78.95'i (15/19) orta duyarlı saptandı ve dirençli izolat bulunmadı.

Literatürdeki çalışmalarda imipenem verileri arasında belirgin farklılıklar gözlenmektedir. Bu çalışma ile benzer şekilde Tang ve ark., Yang ve ark. ile Hatakeyama ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmalarda izolatların sırasıyla %78 (202/256) (10), %70 (64/92) (7) ve %69.2'si (11) imipeneme orta duyarlı bulunmuş; Hatakeyama ve ark.'nın çalışmasında dirençli izolata rastlanmamıştır. Bazı çalışmalarda ise bu çalışmanın aksine imipenem direnci %83 ile %100 arasında (9, 99, 100, 102) bulunmuştur. Park ve ark. tarafından yapılan çalışmada izolatların %55'i (36/66) imipeneme duyarlı bulunmuş ve *M.*

abscessus tedavisinde sefoksitin kullanılmadığı durumlarda imipenemin iyi bir alternatif oluşturabileceği belirtilmiştir (95). Bu çalışmada da sefoksitine dirençli izolatların (%57.9) hiçbirinde imipenem direncine rastlanmaması ve kılavuzlarda *M. abscessus* tedavi rejimlerinde alternatif ilaç olarak imipenemin kullanılabileceği belirtilmesi nedeniyle özellikle sefoksitin direnci saptanan durumlarda, bir diğer beta laktam grubu üyesi olan imipenemin tedavide faydalı olabileceği düşünülmektedir (2).

Bu çalışmada florokinolon grubunda bulunan antimikrobiallerden siprofloksasine duyarlı %15.79 (3/19), orta duyarlı %15.79 (3/19), dirençli %68.42 (13/19); moksifloksasine duyarlı %15.79 (3/19) ve dirençli %84.21 (16/19) oranında *M. abscessus* izolatı saptandı.

Aono ve ark. tarafından 85 izolatın hepsi moksifloksasine dirençli (100), Çavuşoğlu ve ark. tarafından yedi izolatın tümü siprofloksasine dirençli (9) bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda; siprofloksasin direnci %69.8-100, moksifloksasin direnci %54-97 oranları arasında bulunmuş (7, 10, 11, 99, 101-103); bu çalışmalarda bizim çalışmamızla uyumlu olarak hem siprofloksasin hem de moksifloksasin için yüksek direnç oranları saptanmıştır. Çalışmamızda aynı grupta yer alan iki antimikrobiyal de *M. abscessus* izolatlarında yüksek direnç oranları gösterdiği için bahsi geçen florokinolonların tedavideki yerinin kısıtlı olduğu düşünülebilir.

Bu çalışmada doksisisikline; *M. abscessus* izolatlarının %5.26'sı (1/19) duyarlı, %94.74'ü (18/19) dirençli saptandı. *M. abscessus* izolatlarında en düşük aktivite gösteren antimikrobiyal doksisisiklin oldu.

Bu çalışma ile uyumlu olarak Park ve ark.'nın çalışmasında %7 (5/74) (95), Aono ve ark.'nın çalışmasında %1.2 (100) oranında izolat için doksisisiklin duyarlı saptanmış ve test edilen en az etkili antimikrobiyal olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde birçok çalışmada %70-100 arasında değişen oranlarda doksisisikline yüksek direnç gösterilmiştir (7, 9, 10, 97-99, 101-104).

M. abscessus türlerinin linezolid duyarlılıkları değişkenlik göstermektedir (47). Bu çalışmada linezolid için *M. abscessus* izolatlarının %21.05'i (4/19) duyarlı, %42.11'i (8/19) orta duyarlı, %36.84'ü (7/19) dirençli saptandı.

Daha önce yapılmış çalışmalardaki linezolid verileri arasında belirgin farklılıklar gözlenmektedir. Bu çalışma ile benzer şekilde Tang ve ark. tarafından izolatların, %42'si

(128/306) linezolidde orta duyarlı bulunmuştur (10). Aono ve ark.'nın çalışmasında %84.7 (100), Buchanan ve ark.'nın çalışmasında %75.8 (47/62) (98) ile Ananta ve ark.'nın çalışmasında %61.76 (42/68) (99) oranında linezolidde dirençli izolat saptanmış ve çalışmamızın aksine yüksek direnç oranları tanımlanmıştır. Bunun aksine; Pang ve ark., Da Mata-Jardín ve ark., Shen ve ark. ile Hatakeyama ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmalarda izolatların sırasıyla %96.36 (53/55) (6), %90.5 (101), %80 (16/20) (97) ve %76.9'u (11) linezolidde duyarlı saptanmış; bu çalışmalarda linezolid *M. abscessus* izolatlarının en duyarlı olduğu antimikrobialardan biri olarak bulunmuştur. *M. abscessus* enfeksiyonlarında linezolidin, duyarlılık sonuçları değerlendirilerek, çoklu ilaç tedavisinde alternatif seçenek olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (51). Literatürde ve çalışmamızda gözlenen değişken linezolid duyarlılık oranları da tedavi öncesinde duyarlılık durumunun belirlenmesinin önemini göstermektedir.

Klaritromisin, tüberküloz dışı mikobakterilerin tedavisinde altın standart ajan olarak değerlendirilmektedir (14). *M. abscessus* subsp. *abscessus* suşlarının yaklaşık %80'i erken veya geç klaritromisin direncine yol açan indüklenebilir *erm* geni içermektedirler ve üç günlük inkübasyon süresi sonunda duyarlı olarak saptanırken 14 günlük inkübasyon sonrasında dirençli hale geldikleri görülebilmektedir (indüklenebilir makrolid direnci). *M. abscessus* subsp. *massiliense* işlevsiz bir *erm* genine sahip olduğundan bu organizmaya bağlı enfeksiyonlarda makrolid tedavisi etkili olabilmektedir (14, 47, 92, 93). Bu nedenlerle *M. abscessus*'un alt türlerinin doğru tanımlanması önemlidir.

Bu çalışmada klaritromisin üçüncü gün değerlendirmesinde; *M. abscessus* izolatlarının %73.68'i (14/19) duyarlı, %15.79'u (3/19) orta duyarlı, %10.53'ü (2/19) dirençli bulundu. CLSI önerileri doğrultusunda 14. güne kadar devam edilen inkübasyon sonucunda ise klaritromisine; *M. abscessus* izolatlarının %21.05'i (4/19) duyarlı, %78.95'i (15/19) dirençli saptandı. İnkübasyon sürecinde bazı izolatlarda duyarlıdan dirençliye kategorik değişim gözlenmesi, indüklenebilir makrolid direnci lehine yorumlandı (12).

Cho ve ark.'nın *M. abscessus* izolatlarının klaritromisine direncini alt tür düzeyinde inceledikleri çalışmalarında; *M. abscessus* subsp. *abscessus* izolatları üçüncü günde %12.3 (34/277), 14. günde %84.1 (233/277) oranında dirençli; *M. abscessus* subsp. *massiliense* izolatları ise hem üçüncü hem de 14. günde sadece %6.3 (17/269) oranında dirençli bulunmuştur (103). Kim ve ark.'nın yaptığı benzer çalışmada klaritromisin direnci *M.*

abscessus subsp. *abscessus* izolatlarında üçüncü günde %2.9 (1/35), 14. günde %88.6 (31/35) iken; *M. abscessus* subsp. *massiliense* izolatlarında hem üçüncü hem de 14. günde klaritromisin direnci saptanmamıştır (104). *M. abscessus* izolatlarında klaritromisine duyarlılık durumunu uzamış inkübasyon süresi ile değerlendiren Shen ve ark. tarafından üçüncü günde %20 (4/20), 14. günde %35 (7/20) oranında direnç bulunmuş (97); Da Mata-Jardín ve ark.'nın çalışmasında üçüncü günde dirençli izolat saptanmazken, 14. günde %28.6 (101) oranında direnç gözlemlendiğini bildirilmiştir. Bu çalışmalarda çalışmamızla benzer şekilde klaritromisine duyarlı olan *M. abscessus* izolatlarında 14. güne uzatılan inkübasyon ile indüklenebilir makrolid direnci gösterilmiştir. Aono ve ark.'nın çalışmasında klaritromisin direnci *M. abscessus* subsp. *abscessus* izolatlarında %93.8, *M. abscessus* subsp. *massiliense* izolatlarında ise %2.9 oranında bulunmuştur (100). Ananta ve ark. tarafından *M. abscessus* için %42.64 (29/68) oranında klaritromisin direnci saptanmış, bu grup içinde *M. abscessus* subsp. *massiliense* alt türündeki izolatlar %24.32 (9/37) oranında dirençli bulunmuştur (99). Çalışmalar *M. abscessus* izolatlarında hem alt tür düzeyinde tanımlamanın hem de 14 güne uzatılan inkübasyonun klaritromisin duyarlılık durumunun değerlendirmesindeki önemini göstermektedir. Çalışmamızdaki kısıtlılıklardan biri *M. abscessus* izolatlarının alt tür düzeyinde tanımlanmamış olmasıdır.

ii. *M. chelonae*

M. chelonae kaynaklı ciddi cilt, kemik ve yumuşak doku hastalığı için kombine çoklu ilaç tedavisi (makrolid direnci riskini en aza indirmek için) gerekmektedir. Abse oluşumu veya ilaç tedavisinin zor olduğu durumlarda cerrahi gerekebilmektedir. *M. chelonae* akciğer hastalığının tedavisi *M. abscessus* tedavisine benzerdir (93). *M. chelonae* suşlarında tobramisin amikasine göre daha etkilidir, tüm suşlar sefoksitine in-vitro dirençli olduğu için imipenem ikinci parenteral seçenektir (2, 93). İn-vitro duyarlılığa göre en az iki ilaçla kombine ilaç tedavisi yapılmalıdır (2, 93).

Bu çalışmada *M. chelonae* izolatlarının duyarlılık oranları; amikasine %100 (4/4), tobramisine %100 (4/4), klaritromisine %100 (4/4), moksifloksasine %50 (2/4), siprofloksasine %25 (1/4), doksisikline %25 (1/4), imipeneme %25 (1/4) ve linezolidde %25 (1/4) olarak bulundu. Sefoksitine ise izolatların tamamı dirençliydi.

Genel olarak diğer HÜM türlerine nazaran antibiyotiklere daha dirençli olan *M. chelonae* izolatları amikasine duyarlı veya orta duyarlıdır (2, 47). *M. chelonae* izolatlarında

tobramisinin in-vitro aktivitesi amikasine göre daha yüksek olup, tedavisinde aminoglikozid olarak amikasin yerine tobramisin tercih edildiği tek HÜM türü *M. chelonae*'dir (2, 47). Bu bilgilerle de uyumlu olarak bu çalışmada *M. chelonae* izolatlarının tümü amikasin ve tobramisine duyarlı saptandı.

Bu çalışmayla uyumlu olarak, çeşitli çalışmalarda amikasine duyarlı izolat oranı %71.4-100 ve tobramisine duyarlı izolat oranı %83.3-100 arasında bulunmuştur (6, 9, 11, 101). Bu çalışmanın aksine; Aono ve ark.'nın çalışmasında amikasine duyarlı izolat saptanmazken tobramisine izolatların %16.7'si duyarlı (100); Heidarieh ve ark.'nın çalışmasında izolatların %20'si (8/39) amikasine, %31'i (12/39) tobramisine (102) duyarlı bulunmuş, aminoglikozidlere düşük in vitro aktivite izlenmiştir. Tang ve ark. ile Yang ve ark.'nın çalışmalarında ise izolatların sırası ile %86'sı amikasine, %18'i (2/11) tobramisine (10); %100'ü (39/39) amikasine, %31'i (12/39) tobramisine duyarlı (7) bulunmuş ve çalışmamızın aksine tobramisin aktivitesinin daha düşük olduğu görülmüştür.

M. chelonae sefoksitine oldukça dirençli, imipeneme ise duyarlı veya orta duyarlı bulunmaktadır. Bu nedenle imipenem sefoksitin yerine tercih edilecek antimikrobiyal ajan olarak verilmiştir (2, 47, 93, 105). Bu çalışmada *M. chelonae* izolatlarının sefoksitin için; %25'i (1/4) orta duyarlı, %75'i (3/4) dirençli saptanırken duyarlı izolat görülmedi; imipenem için ise %25'i (1/4) duyarlı, %75'i (3/4) orta duyarlı saptanırken dirençli izolat görülmedi.

Bu verilerle uyumlu olarak Da Mata-Jardín ve ark.'nın çalışmasında 13 *M. chelonae* izolatının %46.2'si sefoksitine dirençli bulunmuş, sefoksitine duyarlı izolat saptanmamış; %46.2'si imipeneme duyarlı bulunmuş ve imipeneme dirençli izolat saptanmamıştır (101). Heidarieh ve ark. tarafından sefoksitine %31 (12/39), imipeneme %54 (21/39) (102); Yang ve ark. tarafından sefoksitine %31 (12/39), imipeneme %51 (20/39) (7) oranında izolat dirençli bulunmuş ve imipenem için çalışmamızından yüksek direnç oranları gösterilmiştir. Hatakeyama ve ark. tarafından 12 izolat içerisinde %58.3 oranında izolat imipeneme duyarlı bulunmuş, bulgularımıza benzer olarak imipenem direnci gösterilmemiştir (11). Bu çalışmada *M. chelonae* izolatlarının çoğunun sefoksitine dirençli, imipeneme ise orta duyarlı bulunması *M. chelonae* tedavisinde sefoksitin yerine imipenem kullanılmasını öneren kaynaklar ile uyum göstermektedir (2, 47, 93, 105).

M. chelonae izolatlarının siprofloksasine duyarlı veya orta duyarlı saptanma oranı %20 olarak belirtilmiştir (2, 105). Çalışmamızda da bu kaynaklarla uyumlu olarak *M. chelonae* izolatlarının florokinolon grubunda bulunan antimikrobiyallerden siprofloksasine %25'i (1/4) duyarlı, %75'i (3/4) dirençli; moksifloksasine %50'si (2/4) duyarlı ve %50'si (2/4) orta duyarlı saptandı. Çalışmamızda *M. chelonae* izolatlarında moksifloksasin direnci gözlenmedi.

Çeşitli çalışmalarda; siprofloksasin direnci %75-100, moksifloksasin direnci %41.7-59 oranları arasında bulunmuştur (7, 11, 102); bu çalışmalarda çalışmamızla uyumlu olarak moksifloksasine kıyasla siprofloksasin için daha yüksek direnç oranları saptanmıştır. Pang ve ark. ile Da Mata-Jardín ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda *M. chelonae* izolatlarının sırasıyla siprofloksasine ve moksifloksasine duyarlılık oranları; %33 ile %100 ve %7.7 ile %76.9 olarak bulunmuştur (6, 101); bahsi geçen çalışmalarda siprofloksasine göre moksifloksasine duyarlı izolatların çalışmamıza benzer şekilde daha fazla olduğu gözlenmiştir.

M. chelonae izolatlarının doksisisikline duyarlı veya orta duyarlı saptanma oranı %20-25 olarak belirtilmiştir (2, 47, 105). Çalışmamızda da bu kaynaklarla uyumlu olarak doksisisikline *M. chelonae* izolatlarının %25'i (1/4) duyarlı, %75'i (3/4) dirençli saptandı. Çalışmamıza benzer şekilde Da Mata-Jardín ve ark. tarafından 13 izolatın %38.5'i duyarlı, %61.5'i dirençli (101); Aono ve ark. tarafından 12 izolatın %25'i duyarlı, %75'i dirençli (100) bulunmuştur. Çalışmamızın aksine Heidarieh ve ark. ile Yang ve ark.'nın çalışmalarında izolatların tümü doksisisikline dirençli bulunmuş ve çalışmamızdan daha yüksek direnç oranları gösterilmiştir (7, 102).

Linezolidin *M. chelonae*'ye karşı etki gösterdiği in-vitro koşullarda gösterilmiştir. Klaritromisine karşı kazanılmış dirençli dissemine *M. chelonae* enfeksiyonları dahil olmak üzere HÜM türlerine bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde linezolid kullanılmaktadır (14, 47, 93). *M. chelonae* izolatlarının linezolide duyarlı veya orta duyarlı saptanma oranı %90 olarak belirtilmiştir (2, 105). Bu çalışmada da benzer olarak *M. chelonae* izolatlarının linezolide %25'i (1/4) duyarlı, %75'i (3/4) orta duyarlı saptanırken, dirençli izolata rastlanmadı.

M. chelonae'da fonksiyonel *erm* geni bulunmadığından klaritromisin MİK değerlerinde uzamış inkübasyon ile çok az değişiklik olmakta ya da hiçbir değişiklik

olmamaktadır (14, 47, 93). *M. chelonae* izolatlarının klaritromisine duyarlı veya orta duyarlı saptanma oranı %100 olarak belirtilmiştir (2, 105). Bu çalışmada da *M. chelonae* izolatları, üçüncü ve 14. gün klaritromisin MİK değerleri $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ saptanarak duyarlı bulundu. Bu verilerle uyumlu olarak çeşitli çalışmalarda *M. chelonae* izolatlarının %100'ü klaritromisine duyarlı bulunmuştur (9, 11, 101). Bu çalışmanın aksine hem Heidarieh ve ark. hem de Yang ve ark.'nın çalışmalarında izolatların %49'u (19/39) klaritromisine duyarlı bulunmuştur (7, 102); beklenenden daha düşük klaritromisin duyarlılığı saptanmasının olası nedenlerinden ise bahsedilmemiştir.

Az sayıda *M. chelonae* izolatının değerlendirilmiş olması bu çalışmanın kısıtlılıklarından biri olarak görülmekte, daha büyük gruplar ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

iii. *M. fortuitum*

M. fortuitum enfeksiyonları genellikle in-vitro duyarlılık testine dayanan iki ilaçlı kombine rejimle tedavi edilebilir. Bu rejim florokinolon, doksisisiklin, amikasin veya sülfonamidleri içerebilir. *M. fortuitum*'un indüklenebilir makrolid direnci sağlayan *erm* genine sahip olduğu bilinmektedir; bu nedenle makrolidler dikkatle kullanılmalıdır (92, 93).

Bu çalışmada *M. fortuitum* izolatlarının duyarlılık oranları; amikasine %100 (35/35), siprofloksasine %100 (35/35), moksifloksasine %100 (35/35), imipeneme %57.14 (20/35), linezolidde %37.14 (13/35), sefoksitine %20 (7/35), doksisisikline %5.71 (2/35), tobramisine %2.86 (1/35), klaritromisine üçüncü günde %32.35 (11/34) ve 14. günde %2.94 (1/34) olarak saptandı. İzolatların tamamı sefoksitine ve imipeneme duyarlı idi.

M. fortuitum izolatları çalışmalarda genel olarak amikasine duyarlı veya orta duyarlı görülmektedir (47). Bu çalışmada *M. fortuitum* izolatlarının tümü amikasine duyarlı saptandı. Çalışmada yer alan diğer aminoglikozid tobramisine ise izolatların %2.86'sı (1/35) duyarlı, %11.43'ü (4/35) orta duyarlı, %85.71'i (30/35) dirençli saptandı.

Çeşitli çalışmalarda bu çalışma ile uyumlu olarak; *M. fortuitum* izolatlarının tümü amikasine duyarlı ve tobramisine dirençli görülmüştür (9, 11, 100). Benzer şekilde Da Mata-Jardín ve ark.'nın çalışmasında 66 izolatın %98.5'i amikasine duyarlı, %81.8'i tobramisine dirençli saptanmış; amikasine orta duyarlı saptanan bir izolatın sekans analizi ile *Mycobacterium mageritense* olduğu gösterilmiştir (101). Çalışmamızın aksine Gole ve

ark.'nın çalışmasında *M. fortuitum* izolatlarının %86.36'sı (19/22) amikasinine, tümü (22/22) tobramisine dirençli saptanmış; amikasinine yüksek direnç oranının hastaların uzun süreli hastane yatışlarına ve aminoglikozidlerin tekli ilaç tedavisinde kullanılmasına bağlı olabileceği belirtilmiştir (106). Shen ve ark. tarafından izolatların tümü (17/17) amikasinine ve tobramisine duyarlı (97); Heidarieh ve ark. tarafından izolatların %94'ü (80/85) amikasinine duyarlı, %97'si (83/85) tobramisine duyarlı (102) bulunmuş, çalışmamızın aksine tobramisine yüksek duyarlı saptanmıştır.

Amikasin *M. fortuitum* tedavisinde ATS tarafından önerilen ilaçlar içinde bulunmaktadır (2). Sonuçlarımız amikasinin *M. fortuitum*'un neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada tobramisine yüksek direnç gösterilmesi, tobramisinin *M. fortuitum* tedavisinde yer almaması gerektiğini belirten kılavuzlarla uyum göstermektedir (2, 12).

Rehberlerde *M. fortuitum*'un çoğunlukla sefoksitine duyarlı veya orta duyarlı olduğu belirtilmektedir (2, 47). Bu çalışmada da bu kaynaklarla uyumlu olarak sefoksitine *M. fortuitum* izolatlarının %20'si (7/35) duyarlı, %80'i (28/35) orta duyarlı saptandı; dirençli izolat görülmedi.

Çeşitli çalışmalarda bu çalışma ile uyumlu olarak; *M. fortuitum* izolatlarının çoğu sefoksitine (%61-90.7) orta duyarlı saptanmış, düşük direnç oranları (%0-10) görülmüştür (7, 10, 100, 102). Çavuşoğlu ve ark., Pang ve ark. ile Da Mata-Jardín ve ark.'nın çalışmalarında sefoksitine duyarlı izolat oranları sırası ile %100, %81.82 ve %59.1 bulunarak çalışmamızdan daha yüksek saptanmıştır (6, 9, 101). Shen ve ark. ile Gole ve ark.'nın çalışmalarında ise sefoksitine direnç oranları sırası ile %88 (15/17) ve %77.27 (17/22) bulunmuş ve çalışmamızın aksine yüksek direnç saptanmıştır (97, 106).

M. fortuitum'un çoğunlukla imipeneme duyarlı veya orta duyarlı olduğu belirtilmektedir (2, 47). Bu çalışmada da benzer şekilde imipeneme *M. fortuitum* izolatlarının %57.14'ü (20/35) duyarlı, %42.86'sı (15/35) orta duyarlı saptandı, dirençli izolat görülmedi.

İmipeneme direnç durumunun çalışmalar arası belirgin farklar gösterdiği görülmektedir. Da Mata-Jardín ve ark.'nın çalışmasında %92.4, Hatakeyama ve ark.'nın çalışmasında %66.7 oranında izolat imipeneme duyarlı saptanmış; çalışmamıza benzer olarak imipenem direnci görülmemiştir (11, 101). Aono ve ark.'nın çalışmasında izolatların

%14'ü imipeneme dirençli görülmüştür; imipenem MİK değeri 8 µg/mL üzerinde olan izolatlarda CLSI tarafından önerilen test tekrarının yapılmaması imipenem direncinin yüksek saptanmasının olası bir nedeni olarak belirtilmiştir (100). Shen ve ark.'nın çalışmasında %70 (12/17), Tang ve ark.'nın çalışmasında %67 (57/85) oranında izolat orta duyarlı bulunmuştur (10, 97). Gole ve ark.'nın çalışmasında ise imipeneme %68.18 (15/22) oranı ile yüksek direnç görüldüğü belirtilmiştir (106). MİK testlerinde inkübasyon süresinin uzamasının imipenem stabilitesini azaltarak değişken sonuçlara neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (107); bu durumun literatürde gözlenen değişken imipenem duyarlılığının nedeni olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda direnç gözlenmemesi imipenemin *M. fortuitum* izolatlarının tedavisinde kullanılabilecek alternatif ilaçlardan biri olduğunu düşündürmektedir ancak in-vitro duyarlılık durumunun tedavi cevabı ile uyumunu değerlendirecek klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

M. fortuitum izolatlarının siprofloksasine ve moksifloksasine çoğunlukla duyarlı veya orta duyarlı olduğunu belirten kaynaklar mevcuttur (2, 47, 93). Bu çalışmada da uyumlu olarak siprofloksasin ve moksifloksasin *M. fortuitum* izolatlarının tümünde (35/35) duyarlı bulundu.

Çeşitli çalışmalarda bu çalışma ile uyumlu olarak; siprofloksasin %76.19-100 (9, 10, 11, 101, 108), moksifloksasin %97.7-100 (10, 11, 100, 101) oranı arasında *M. fortuitum* izolatında duyarlı saptanmıştır. Bazı çalışmalarda *M. fortuitum* izolatlarında siprofloksasine duyarlı izolat oranı %39-62, moksifloksasine duyarlı izolat oranı %61-73 arasında saptanmış, çalışmamızdan daha düşük duyarlılık oranları gözlenmiştir (6, 7, 102). Bu çalışmanın aksine Gole ve ark. tarafından *M. fortuitum* izolatlarının hepsi (22/22) siprofloksasine dirençli saptanmış ve yüksek direnç oranı, direnç verilerinin coğrafi farklılıklar göstermesi ile ilişkilendirilmiştir (106). Bu çalışmada florokinolonlar amikasin ile birlikte *M. fortuitum* için en yüksek aktivite gösteren antibiyotikler olarak saptanmıştır.

M. fortuitum izolatlarının doksisisikline duyarlı saptanma oranı %50 olarak belirtilmiştir (2, 47). Bu çalışmada ise doksisisikline *M. fortuitum* izolatının %5.71'i (2/35) duyarlı, %14.29'u (5/35) orta duyarlı, %80'i (28/35) dirençli olarak saptandı ve yüksek direnç görüldü.

Çeşitli çalışmalarda bu çalışmaya benzer şekilde doksisisikline dirençli izolat oranları %60.5-88 arasında bulunmuştur (7, 97, 100, 109). Bu çalışmanın aksine doksisisikline; Da

Mata-Jardín ve ark. tarafından izolatların %51.5'i duyarlı (101); Heidarieh ve ark. tarafından izolatların %47'si orta duyarlı (102) bulunmuştur. Bu çalışmada doksisisikline direnç oranının yüksek, duyarlı izolat oranının ise düşük saptanması sebebiyle *M. fortuitum* izole edilen hastalarda, doksiklin ile tedaviden kaçınılması veya tedavi öncesi doksisisiklin duyarlılık test sonuçlarına göre tedavinin yönlendirilmesinin faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Linezolidin *M. fortuitum*'a karşı in-vitro aktivitesi gösterilmiştir (14, 47). Bu çalışmada linezolide *M. fortuitum* izolatlarının %37.14'ü (13/35) duyarlı, %34.29'u (12/35) orta duyarlı, %28.57'si (10/35) dirençli saptandı.

Çeşitli çalışmalarda, bu çalışmadan farklı olarak, linezolide duyarlı izolat oranları %85-100 arasında saptanmış ve linezolid *M. fortuitum* izolatları için en yüksek aktivite gösteren ilaçlar arasında bulunmuştur (6, 10, 11, 101). Gole ve ark. tarafından ise izolatların tümü linezolide dirençli (22/22) bulunmuştur (106). Shen ve ark.'nın çalışmasında izolatların %70'i (12/17) orta duyarlı, %18'i (3/17) dirençli görülmüş ve saptanan düşük direnç oranları göz önünde bulundurularak linezolidin *M. fortuitum* tedavisinde iyi bir seçenek olabileceği belirtilmiştir (97). Bu çalışmada linezolid duyarlılık durumunun belli bir kategoride baskın bulunmadığı görülmektedir; bu nedenle *M. fortuitum* izole edilen hastalarda, duyarlılık testi sonucuna göre kombine ilaç tedavisinde linezolid seçimine karar verilmesini önerebiliriz.

M. fortuitum izolatları makrolidlere direnç sağlayan indüklenebilir eritromisin metilaz *erm* geni içerebilmektedir (14, 47, 93).

Bu çalışmada klaritromisin üçüncü gün değerlendirmesinde; *M. fortuitum* izolatlarının %32.35'i (11/34) duyarlı, %50'si (17/34) orta duyarlı, %17.65'i (6/34) dirençli bulundu. CLSI önerileri doğrultusunda 14. güne kadar devam edilen inkübasyon sonucunda ise klaritromisine; *M. fortuitum* izolatlarının %2.94'ü (1/34) duyarlı, %97.06'sı (33/34) dirençli saptandı. Inkübasyon sürecinde bazı izolatlarda duyarlıdan dirençliye kategorik değişim gözlenmesi, indüklenebilir makrolid direnci lehine yorumlandı (12).

M. fortuitum izolatlarında klaritromisine duyarlılık durumunu uzamış inkübasyon süresi ile değerlendiren Shen ve ark.'nın çalışmasında üçüncü günde %94 (16/17), 14. günde %100 (17/17) (97); Da Mata-Jardín ve ark.'nın çalışmasında üçüncü günde %33.3, 14. günde %72.7 (101) oranında izolat klaritromisine dirençli bulunmuş ve çalışmamızla uyumlu olarak klaritromisine yüksek direnç oranları gözlenmiştir. Kim ve ark.'nın üçüncü

ve 14. gün klaritromisin değerlendirmesi yapılan çalışmasında izolatların %5'i (2/44) duyarlı bulunmuş, %84'ünde (37/44) indüklenebilir makrolid direnci saptanmıştır (110). İnkübasyon süresinin uzatılmadığı bazı çalışmalarda klaritromisine duyarlı izolat oranlarının %65-71.42 arasında değiştiği ve çalışmamızın hem üçüncü gün hem de 14. gün değerlerinden daha yüksek olduğu görülmüştür ancak bu çalışmalarda indüklenebilir makrolid direnci taranmadığı için sonuçlar izolatların gerçek durumunu yansıtmayabilir (7, 102, 108). Uzun inkübasyon sonucu mevcut olmayan birkaç çalışmada ise klaritromisine dirençli izolat oranının %77.8-100 arasında bulunduğu ve çalışmamızın üçüncü gün değerlendirme sonuçlarından daha yüksek olduğu görülmüştür (100, 106, 109, 111).

Optimum koşullarda bile, dilüsyon testleri tekrarlandığında aynı sonucu vermeyebilir. Genel olarak, testin kabul edilebilir tekrarlanabilirliği, gerçek MİK değeri ile ± 1 dilüsyon (iki kat seri dilüsyon) fark görülmesi olarak belirtilmektedir (94). *M. abscessus* izolatlarında amikasin için tekrarlanabilirlik sorunları olduğu bilinmektedir, sorunun nedenleri açıkça ortaya konulmamış olsa da kategori değişiminin dar MİK aralığında olması duyarlılık kategorisinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır (112). Bu çalışmada amikasin MİK değeri 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ saptanan ve dirençli kategoride bulunan dört *M. abscessus* izolatı CLSI önerileri doğrultusunda tekrar test edildi (12). Tekrarlanan testlerde iki izolat için amikasin MİK değeri bir önceki değerlendirme ile aynı (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dirençli) bulunurken, iki izolat için bir önceki testte saptanan MİK değeri ile bir dilüsyon fark (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, orta duyarlı) bulundu. İmipenem MİK değeri 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ saptanan ve orta duyarlı kategoride bulunan bir *M. fortuitum* izolatı CLSI önerileri doğrultusunda tekrar test edildi (12). Tekrarlanan imipenem MİK değeri 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (orta duyarlı) saptandı, bir önceki test sonucu ile bir dilüsyon fark gözlendi, bu sonuç kategori değişimine neden olmadı. Her iki antimikrobiyal için yapılan tekrar testlerinde MİK değerlerinde en fazla bir dilüsyon fark görüldü, bu değer kabul edilebilir aralıkta olmakla birlikte izolat sonuçlarında kategori değişimine neden olabilmektedir. CLSI önerilerinde bu durumda değerlendirmeye alınması gereken sonuçlarla ilgili yönlendirici bir bilgi bulunmamaktadır. Literatür verilerini ve hasta örneklerinde tedavi planlamasını değiştirebilecek olan bu durumun standart bir çözüme kavuşturulması gerektiğini düşünmekteyiz.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonuçlarına göre bölgemizden izole edilen HÜM izolatlarının en duyarlı olduğu antimikrobiyal amikasin iken en dirençli olduğu ajan doksisisiklin olarak saptandı. Tobramisin ise *M. chelonae* izolatlarının en duyarlı olduğu antimikrobiyal iken *M. abscessus* ve *M. fortuitum* izolatlarının yüksek direnç gösterdiği antimikrobiyallerden biri olarak belirlendi. *M. abscessus* ve *M. fortuitum* izolatlarında farklı inkübasyon zamanlarında duyarlılık durumlarının değişmesi ve gözlenen indüklenebilir makrolid dirençleri ADT çalışmalarında klaritromisin inkübasyonunun 14. güne uzatılmasının önemini vurguladı.

Bu çalışmada çeşitli kısıtlılıklar mevcuttur. Bunlar çalışma grubunun küçük olması, makrolid direncine yönelik gen bölgelerinin ileri incelemesinin ve duyarlılık durumlarında farklılık gösterebilen alt türlere yönelik tanımlamaların yapılamamış olması olarak sıralanabilir. Ayrıca, HÜM izole edilen hastaların tedavi öykülerinin bilinmemesi, olası antibiyotik kullanımına sekonder gelişen direnci gözden kaçırmamıza neden olmuş olabilir.

Özetle, bu çalışmanın sonucunda HÜM enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla tercih edilen antibiyotiklerin, hastanemizde saptanmış türlere karşı in-vitro aktivitesi konusunda oldukça yararlı bilgiler edinildiğini düşünmekteyiz. Bölgesel verilerin literatürle her zaman örtüşmediği de göz önünde bulundurulduğunda HÜM enfeksiyonu saptanan ancak ADT çalışılmayan durumlarda sonuçlarımız ampirik tedavi seçiminde yol gösterici olacaktır. Bu çalışmada antimikrobiyal duyarlılık durumunun türler arasında farklı olduğu gösterilmiştir; bu durum klinik izolatin tür seviyesinde doğru olarak belirlenmesinin önemini ve tedavi planlarına rehberlik edebileceğini göstermektedir. Özellikle tedaviye dirençli olgularda, türler arası duyarlılık durumu değişkenliği de göz önüne alarak, zahmetli ve zaman alıcı olsa da altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre tedavinin düzenlenmesini önermekteyiz.

9. KAYNAKLAR

1. Gonzalez-Santiago TM, Drage LA. Nontuberculous Mycobacteria: Skin and Soft Tissue Infections. *Dermatol Clin.* 2015;33(3):563-77. doi: 10.1016/j.det.2015.03.017.
2. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases [published correction appears in *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Apr 1;175(7):744-5. Dosage error in article text]. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(4):367–416. doi:10.1164/rccm.200604-571ST.
3. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res.* 2004;120(4):290–304.
4. Henkle E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. *Clin Chest Med.* 2015 Mar;36(1):91-9. doi: 10.1016/j.ccm.2014.11.002.
5. RUNYON EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am.* 1959;43(1):273–290. doi:10.1016/s0025-7125(16)34193-1.
6. Pang H, Li G, Zhao X, Liu H, Wan K, Yu P. Drug Susceptibility Testing of 31 Antimicrobial Agents on Rapidly Growing Mycobacteria Isolates from China. *Biomed Res Int.* 2015;2015:419392. doi: 10.1155/2015/419392.
7. Yang SC, Hsueh PR, Lai HC, et al. High prevalence of antimicrobial resistance in rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(6):1958–1962. doi:10.1128/aac.47.6.1958-1962.2003.
8. Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):716–746. doi:10.1128/cmr.15.4.716-746.2002.
9. Cavusoglu C, Gurpinar T, Ecemis T. Evaluation of antimicrobial susceptibilities of rapidly growing mycobacteria by Sensititre RAPMYCO panel. *New Microbiol.* 2012;35(1):73–76.

10. Tang SS, Lye DC, Jureen R, Sng LH, Hsu LY. Rapidly growing mycobacteria in Singapore, 2006-2011. *Clin Microbiol Infect.* 2015 ;21(3):236-41. doi: 10.1016/j.cmi.2014.10.018.
11. Hatakeyama S, Ohama Y, Okazaki M, Nukui Y, Moriya K. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):197. doi: 10.1186/s12879-017-2298-8.
12. CLSI. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard—Second Edition.* CLSI document M24-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
13. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech.* 2001;20(1):21–54. doi:10.20506/rst.20.1.1265.
14. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW. *Manual of Clinical Microbiology*, 11th edition. ASM Press, Washington DC, 2015. Book DOI: [10.1128/9781555817381](https://doi.org/10.1128/9781555817381).
15. Wayne LG, Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(1):1–25. doi:10.1128/cmr.5.1.1.
16. Alpaslan A. Non-Tüberküloz Mikobakteri İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı ve Duyarlılık Testleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun. 2003;388–96.
17. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(11):1862–1870. doi:10.1016/j.rmed.2006.08.006.
18. Seber E. Tüberkülozun dünü. *ANKEM Derg.* 2010;24(2):52-60.
19. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017;58(1):E9–E12.
20. Barış İY. Çağlar boyu tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, Samsun, 2003; s1-7.

21. Barış İY. Dünyada Tüberküloz'un Tarihi. *Konuralp Medical Journal*. 2011; 3(2): 1-4.
22. Ligon BL. Robert Koch: Nobel laureate and controversial figure in tuberculin research. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2002;13(4):289–299. doi:10.1053/spid.2002.127205.
23. Billinger ME, Olivier KN, Viboud C, de Oca RM, Steiner C, Holland SM, Prevots DR. Nontuberculous mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998-2005. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(10):1562-9. doi:10.3201/eid1510.090196.
24. Griffith DE. Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2010;23(2):185-90. doi: 10.1097/QCO.0b013e328336ead6.
25. Yüce A. Nontüberküloz Mikobakteri Enfeksiyonlarının Klinik Önemi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun, 2003.
26. Tabarsi P, Baghaei P, Farnia P, et al. Nontuberculous mycobacteria among patients who are suspected for multidrug-resistant tuberculosis-need for earlier identification of nontuberculosis mycobacteria. *Am J Med Sci*. 2009;337(3):182–184. doi:10.1097/maj.0b013e318185d32f.
27. Henry MT, Inamdar L, O'Riordain D, Schweiger M, Watson JP. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. *Eur Respir J*. 2004;23(5):741–746. doi:10.1183/09031936.04.00114004.
28. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. From Basic Science to Patient Care Tuberculosis 2007. www.TuberculosisTextbook.com. First Edition, Brazil.
29. <https://paramedicsworld.com/microbiology-practicals/acid-fast-staining-principle-procedure-interpretation/medical-paramedical-studynotes>.
30. Jankute M, Cox JA, Harrison J, Besra GS. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:405-23. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104121.

31. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun, 2003; s34-47.
32. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol.* 1997;1(4):579–588. doi:10.1016/s1367-5931(97)80055-5.
33. Türk Toraks Derneği. Özkara Ş, Kılıçaslan Z, Bilgiç H, Karadağ M. Toraks Kitapları – Tüberküloz. 2010;Sayı 11. Aves Yayıncılık/ İstanbul.
34. Todar K. Todar's Online Textbook of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/>.
35. Rajni, Rao N, Meena LS. Biosynthesis and Virulent Behavior of Lipids Produced by Mycobacterium tuberculosis: LAM and Cord Factor: An Overview. *Biotechnol Res Int.* 2011;2011:274693. doi: 10.4061/2011/274693.
36. Hiu IJ, Amiel JL. Fatty acid nature and adjuvant activity of wax D from Mycobacterium tuberculosis. *J Gen Microbiol.* 1971;66(2):239–241. doi:10.1099/00221287-66-2-239.
37. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2003;83(1-3):91–97. doi:10.1016/s1472-9792(02)00089-6.
38. Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol.* 2004;53(2):391–403. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04183.x.
39. Kıyan M. *Mycobacteriaceae*. Cengiz AT, Ustaçelebi Ş (Editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, s419-457. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
40. Velayati AA, Farnia P, Saif S. Chapter 2 - Identification of Nontuberculous Mycobacterium: Conventional Versus Rapid Molecular Tests, Ed. Velayati AA, Farnia P, Nontuberculous Mycobacteria (NTM). Academic Press, 2019; 11-59. ISBN 9780128146927. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814692-7.00002-4>.

41. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Seventh edition. Wolters Kluwer Health, Philadelphia, 2017. eISBN 9781469829401.
42. Woods GL, Washington JA 2nd. Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis.* 1987;9(2):275–294. doi:10.1093/clinids/9.2.275.
43. Piersimoni C, Scarparo C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1351–1544. doi:10.3201/eid1509.081259.
44. Iivanainen E, Martikainen PJ, Väänänen P, Katila ML. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. *J Appl Microbiol.* 1999;86(4):673–681. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00711.x.
45. Bland CS, Ireland JM, Lozano E, Alvarez ME, Primm TP. Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(10):5719–5727. doi:10.1128/AEM.71.10.5719-5727.2005.
46. Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis.* 2001;33(8):1363–1374. doi:10.1086/323126.
47. Brown-Elliott BA, Philley JV. Rapidly Growing Mycobacteria. *Microbiol Spectr.* 2017;5(1):10.1128/microbiolspec.TNMI7-0027-2016. doi:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0027-2016.
48. Gonzalez-Santiago TM, Drage LA. Nontuberculous Mycobacteria: Skin and Soft Tissue Infections. *Dermatol Clin.* 2015 Jul;33(3):563-77. doi: 10.1016/j.det.2015.03.017. Epub 2015 May 8. PMID: 26143432.
49. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1979;119(1):107–159. doi:10.1164/arrd.1979.119.1.107.
50. Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(2):177–215.

51. Haworth CS, Banks J, Capstick T, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax*. 2017;72(Suppl 2):ii1–ii64. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210927.
52. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med*. 2015;36(1):13–34. doi:10.1016/j.ccm.2014.10.002.
53. Adjemian J, Daniel-Wayman S, Ricotta E, Prevots DR. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteriosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2018;39(3):325–335. doi:10.1055/s-0038-1651491.
54. van Ingen J, Bendien SA, de Lange WC, et al. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax*. 2009;64(6):502–506. doi:10.1136/thx.2008.110957.
55. Andréjak C, Thomsen VØ, Johansen IS, et al. Nontuberculous pulmonary mycobacteriosis in Denmark: incidence and prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(5):514–521. doi:10.1164/rccm.200905-0778OC.
56. Kennedy MP, O'Connor TM, Ryan C, Sheehan S, Cryan B, Bredin C. Nontuberculous mycobacteria: incidence in Southwest Ireland from 1987 to 2000. *Respir Med*. 2003;97(3):257–263. doi:10.1053/rmed.2003.1431.
57. Gerogianni I, Papala M, Kostikas K, Petinaki E, Gourgoulisanis KI. Epidemiology and clinical significance of mycobacterial respiratory infections in Central Greece. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(7):807–812.
58. Gitti Z, Mantadakis E, Maraki S, Samonis G. Clinical significance and antibiotic susceptibilities of nontuberculous mycobacteria from patients in Crete, Greece. *Future Microbiol*. 2011;6(9):1099–1109. doi:10.2217/fmb.11.91.
59. McCallum AD, Watkin SW, Faccenda JF. Non-tuberculous mycobacterial infections in the Scottish Borders: identification, management and treatment outcomes--a retrospective review. *J R Coll Physicians Edinb*. 2011;41(4):294–303. doi:10.4997/JRCPE.2011.403.

60. Dailloux M, Abalain ML, Laurain C, et al. Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients. *Eur Respir J*. 2006;28(6):1211–1215. doi:10.1183/09031936.00063806.
61. Braun E, Sprecher H, Davidson S, Kassis I. Epidemiology and clinical significance of non-tuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013;17(1):96–99. doi:10.5588/ijtld.12.0237.
62. Varghese B, Memish Z, Abuljadayel N, Al-Hakeem R, Alrabiah F, Al-Hajj SA. Emergence of clinically relevant Non-Tuberculous Mycobacterial infections in Saudi Arabia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2234. Published 2013 May 30. doi:10.1371/journal.pntd.0002234.
63. Shenai S, Rodrigues C, Mehta A. Time to identify and define non-tuberculous mycobacteria in a tuberculosis-endemic region. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(8):1001–1008.
64. Bicmen C, Coskun M, Gunduz AT, Senol G, Cirak AK, Tibet G. Nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: causative agent or not?. *New Microbiol*. 2010;33(4):399–403.
65. Türkel S. Klinik örneklerden izole edilen tüberküloz dışı mikobakterilerin dizi analizi ile tanımlanması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. Tıpta Uzmanlık Tezi, 2013.
66. Özçolpan OO, Sürücüoğlu S, Özkütük N, Çavuşoğlu C. Klinik örneklerden soyutlanan ve DNA dizi analizi ile tanımlanan tüberküloz dışı mikobakterilerin dağılımı [Distribution of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens and identified with DNA sequence analysis]. *Mikrobiyol Bul*. 2015;49(4):484–493. doi:10.5578/mb.9698.
67. Albayrak N, Simşek H, Sezen F, Arslantürk A, Tarhan G, Ceyhan I. Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında 2009-2010 Yıllarında Tespit Edilen Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Dağılımlarının İrdelenmesi [Evaluation of the distribution of non-tuberculous mycobacteria strains isolated in National

- Tuberculosis Reference Laboratory in 2009-2010, Turkey]. *Mikrobiyol Bul.* 2012;46(4):560–567.
68. Koshksaray FK. Çukurova Bölgesindeki Klinik Örneklerde Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) Tür Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana. Yüksek Lisans Tezi, 2015.
69. Cook JL. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *Br Med Bull.* 2010;96:45–59. doi:10.1093/bmb/ldq035.
70. Bryers JD. Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng.* 2008;100(1):1–18. doi:10.1002/bit.21838.
71. Misch EA, Saddler C, Davis JM. Skin and Soft Tissue Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria. *Curr Infect Dis Rep.* 2018;20(4):6. Published 2018 Mar 19. doi:10.1007/s11908-018-0611-3.
72. Carson LA, Petersen NJ, Favero MS, Aguerro SM. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Appl Environ Microbiol.* 1978;36(6):839–846.
73. Honda JR, Knight V, Chan ED. Pathogenesis and risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease [published correction appears in Clin Chest Med. 2015 Jun;36(2):xvii]. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):1–11. doi:10.1016/j.ccm.2014.10.001.
74. Jarzembowski JA, Young MB. Nontuberculous mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(8):1333–1341. doi:10.1043/1543-2165(2008)132[1333:NMI]2.0.CO;2.
75. Koh WJ. Nontuberculous Mycobacteria-Overview. *Microbiol Spectr.* 2017;5(1):10.1128/microbiolspec.TNMI7-0024-2016. doi:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0024-2016.
76. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları.

- Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR). Aydoğdu Ofset Matbaacılık. Ankara, 2014.
77. Leber AL. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Fourth Edition. ASM Press, Washington DC, 2016.
 78. Baylan O. Tüberkülozun kültüre dayali tani yöntemleri [Culture based diagnostic methods for tuberculosis]. *Mikrobiyol Bul.* 2005;39(1):107–124.
 79. CLSI. *Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline*. CLSI document M48-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
 80. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, et al. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol.* 1997;35(2):364–368.
 81. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P. Pretreatment of clinical specimens with sodium dodecyl (lauryl) sulfate is not suitable for the mycobacteria growth indicator tube cultivation method. *J Clin Microbiol.* 1997;35(8):2142–2144.
 82. Somoskovi A, Mester J, Hale YM, Parsons LM, Salfinger M. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2002;23(3):585–597. doi:10.1016/s0272-5231(02)00018-7.
 83. Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin identifikasyonu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kitabı, s300-310. Samsun, 2003.
 84. Martin A, Bombeeck D, Fissette K, et al. Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex from liquid culture. *J Microbiol Methods.* 2011;84(2):255–257. doi:10.1016/j.mimet.2010.12.003.
 85. Yu MC, Chen HY, Wu MH, et al. Evaluation of the rapid MGIT TBc identification test for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex strain detection. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):802–807. doi:10.1128/JCM.02243-10.

86. Appak Ö. Tüberküloz dışı mikobakteri etkenlerinin tür düzeyinde tanımlanması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. Tıpta Uzmanlık Tezi, 2011.
87. Set R, Shastri J. Laboratory aspects of clinically significant rapidly growing mycobacteria. *Indian J Med Microbiol.* 2011;29(4):343–352. doi:10.4103/0255-0857.90157.
88. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem.* 2001;47(5):809–814.
89. Padilla E, González V, Manterola JM, et al. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and genotype Mycobacterium assays for identification of Mycobacterium species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with Mycobacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3083–3088. doi:10.1128/JCM.42.7.3083-3088.2004.
90. Gitti Z, Neonakis I, Fanti G, Kontos F, Maraki S, Tselentis Y. Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS assays to analyze 76 nontuberculous mycobacterial isolates from Greece. *J Clin Microbiol.* 2006;44(6):2244–2246. doi:10.1128/JCM.02088-05.
91. Lee AS, Jelfs P, Sintchenko V, Gilbert GL. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 7):900–904. doi:10.1099/jmm.0.007484-0.
92. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, et al. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(2):e00038-17. Published 2018 Jan 31. doi:10.1128/CMR.00038-17.
93. Kasperbauer SH, De Groote MA. The treatment of rapidly growing mycobacterial infections. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):67–78. doi:10.1016/j.ccm.2014.10.004.
94. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 8th ed. M07-A8. CLSI, Wayne, PA.

95. Park S, Kim S, Park EM, et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus* in Korea. *J Korean Med Sci.* 2008;23(1):49–52. doi:10.3346/jkms.2008.23.1.49.
96. Broda A, Jebbari H, Beaton K, Mitchell S, Drobniewski F. Comparative drug resistance of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates from patients with and without cystic fibrosis in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2013;51(1):217–223. doi:10.1128/JCM.02260-12.
97. Shen Y, Wang X, Jin J, et al. *In Vitro* Susceptibility of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium fortuitum* Isolates to 30 Antibiotics. *Biomed Res Int.* 2018;2018:4902941. Published 2018 Dec 30. doi:10.1155/2018/4902941.
98. Buchanan R, Alexander E. Drug susceptibility of non-tuberculous mycobacteria in East London: A four year retrospective review. *J Infect.* 2018;77(4):349–356. doi:10.1016/j.jinf.2018.07.016.
99. Ananta P, Kham-Ngam I, Chetchotisakd P, et al. Analysis of drug-susceptibility patterns and gene sequences associated with clarithromycin and amikacin resistance in serial *Mycobacterium abscessus* isolates from clinical specimens from Northeast Thailand. *PLoS One.* 2018;13(11):e0208053. Published 2018 Nov 29. doi:10.1371/journal.pone.0208053.
100. Aono A, Morimoto K, Chikamatsu K, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacteroides* (*Mycobacterium*) *abscessus* complex, *Mycobacterium* (*Mycobacterium*) *fortuitum*, and *Mycobacteroides* (*Mycobacterium*) *chelonae*. *J Infect Chemother.* 2019;25(2):117–123. doi:10.1016/j.jiac.2018.10.010.
101. Da Mata-Jardín O, Angulo A, Rodríguez M, Fernández-Figueiras S, de Waard JH. Drug susceptibility patterns of rapidly growing mycobacteria isolated from skin and soft tissue infections in Venezuela [published online ahead of print, 2019 Nov 18]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;10.1007/s10096-019-03740-7. doi:10.1007/s10096-019-03740-7.

102. Heidarieh P, Mirsaedi M, Hashemzadeh M, et al. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Nontuberculous Mycobacteria in Iran. *Microb Drug Resist.* 2016;22(2):172–178. doi:10.1089/mdr.2015.0134.
103. Cho EH, Huh HJ, Song DJ, et al. Drug susceptibility patterns of Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense isolated from respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;93(2):107–111. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.008.
104. Kim SY, Kim CK, Bae IK, et al. The drug susceptibility profile and inducible resistance to macrolides of Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;81(2):107–111. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.10.007.
105. Akram SM, Saleh D. Mycobacterium Chelonae. [Updated 2019 Jul 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430806>.
106. Gole GV, Set R, Khan N, Shastri J. Drug susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria in extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Tuberc.* 2016;63(2):119–122. doi:10.1016/j.ijtb.2016.04.001.
107. Rominski A, Schulthess B, Müller DM, Keller PM, Sander P. Effect of β -lactamase production and β -lactam instability on MIC testing results for Mycobacterium abscessus. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(11):3070–3078. doi:10.1093/jac/dkx284
108. Goswami B, Narang P, Mishra PS, Narang R, Narang U, Mendiratta DK. Drug susceptibility of rapid and slow growing non-tuberculous mycobacteria isolated from symptomatics for pulmonary tuberculosis, Central India. *Indian J Med Microbiol.* 2016;34(4):442–447. doi:10.4103/0255-0857.195375.
109. Li G, Pang H, Guo Q, et al. Antimicrobial susceptibility and MIC distribution of 41 drugs against clinical isolates from China and reference strains of nontuberculous mycobacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(3):364–374. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.10.024.

110. Kim SY, Moon SM, Jhun BW, et al. Species Distribution and Macrolide Susceptibility of *Mycobacterium fortuitum* Complex Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(6):e02331-18. Published 2019 May 24. doi:10.1128/AAC.02331-18.
111. van Ingen J, van der Laan T, Dekhuijzen R, Boeree M, van Soolingen D. In vitro drug susceptibility of 2275 clinical non-tuberculous *Mycobacterium* isolates of 49 species in The Netherlands. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(2):169–173. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.09.023.
112. Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, et al. Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1676–1682.

10. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK
Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4397-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input checked="" type="checkbox"/> MÜNFERİT ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/> YÜKSEKLİSANS <input type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Hızlı Üreyen Mikobakterilerin Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıklarının Belirlenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input checked="" type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2019/01-62	Tarih:18.01.2019				
	Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK'ün sorumlusu olduğu "Hızlı Üreyen Mikobakterilerin Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıklarının Belirlenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Can SEVINÇ (Başkan)	Göğüs Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan Yardımcısı)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL	Tıbbi Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	