

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

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKOBAKTERİLERİN
DİZİ ANALİZİ İLE TANIMLANMASI**

DR. SELÇUK TÜRKEK

UZMANLIK TEZİ

İZMİR - 2013

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

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKOBAKTERİLERİN
DİZİ ANALİZİ İLE TANIMLANMASI**

DR. SELÇUK TÜRKEİ

UZMANLIK TEZİ

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. AYŞE AYDAN ÖZKÜTÜK**

İZMİR – 2013

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2012.KB.SAG.086 sayı ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Asistanlığım boyunca ve tezimin tamamlanması için geçen süreçte bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini ve çabasını benimle paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK'e, eğitimime katkılarından dolayı başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İsmail Hakkı BAHAR olmak üzere tüm değerli hocalarıma, aynı çalışma ortamını paylaşmaktan dolayı mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, bu süreci beraber geçirdiğim merkez laboratuvarı ve anabilim dalında çalışan herkese çok teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim aileme çok teşekkür ederim.

Dr. Selçuk TÜRKEK

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO LİSTESİ	iii
RESİM LİSTESİ	iv
KISALTMALAR.....	v
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	4
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Terminoloji	6
4.2. Tarihçe.....	6
4.3. TDM'lerin Mikrobiyolojik Özellikleri	8
4.3.1. Genel Özellikler ve Hücre Duvarı Yapısı.....	8
4.3.2. Üreme Özellikleri	11
4.3.3. TDM'lerin Genetik Özellikleri	11
4.4. TDM'lerin Sınıflandırılması	13
4.5. TDM'ler ve Çevre İlişkisi.....	15
4.6. TDM'lerin Epidemiyolojisi	16
4.7. TDM'lerde Patogenez ve Virülans Özellikleri	17
4.8. TDM Enfeksiyonlarının Klinik Özellikleri	18
4.9. TDM'lerin Tanısı	20
4.9.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi.....	22
4.9.2. Mikroskopik Değerlendirme.....	23
4.9.3. Kültür Yöntemleri.....	24
4.10. TDM Türlerinin Tanımlanması	27
4.10.1. Fenotipik Testler	27
4.10.2. Moleküler Testler.....	29
5. GEREÇ VE YÖNTEM	34
5.1. Çalışmaya Alınan TDM Suşları.....	34
5.2. TDM'lerin Üretilmesi.....	34
5.3. TDM'lerin DNA İzolasyonu.....	34

5.3.1.	İzolasyonda Kullanılan Gereç ve Kimyasallar.....	34
5.3.2.	DNA İzolasyon Basamakları.....	34
5.4.	TDM'lerin hsp65 gen bölgelerinin PZT ile çoğaltılması.....	35
5.4.1.	PZT'de Kullanılan Gereç ve Kimyasallar.....	35
5.4.2.	PZT Reaksiyon Karışımının Hazırlanması.....	35
5.5.	PZT Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrophorezi.....	36
5.5.1.	Kullanılan Gereç ve Kimyasallar	36
5.5.2.	Yöntem	36
5.6.	DNA Sekans Prosedürü	37
5.6.1.	PZT Ürünlerinin Gönderilmesi ve Hizmet Alımı.....	37
5.6.2.	Gönderilen DNA Dizilerinin Analiz Edilmesi	37
6.	BULGULAR.....	38
7.	TARTIŞMA.....	48
8.	SONUÇ VE ÖNERİLER	54
9.	KAYNAKLAR	55

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. TDM’lerde Runyon sınıflaması.....	12
Tablo 2. Woods ve Washington sınıflaması.....	13
Tablo 3. Runyon sınıflandırılması ve TDM’lerin en sık neden oldukları hastalıklar.....	18
Tablo 4. Karbolfuksin ve florokrom yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi..	22
Tablo 5. Önemli TDM türlerinin biyokimyasal özellikleri.....	26
Tablo 6. Yıllara göre gelen, üreyen ve çalışmaya alınan örnek sayıları.....	36
Tablo 7. Tür tanımı yapılan izolatlar ve uyumluluk oranları.....	38
Tablo 8. Örnek tiplerine göre tanımlanan mikroorganizmaların dağılımı.....	44
Tablo 9. Tanımlanan izolatların yıllara göre dağılımı.....	45

RESİM LİSTESİ

Resim 1.	Mikobakterilerin Erlich Ziehl Neelsen boyama görüntüsü	8
Resim 2.	Mikobakterilerde hücre duvar yapısı.....	9
Resim 3.	LJ besiyerinde üremiş TDM izolatları ve Kinyoun boyama görüntüleri.....	37
Resim 4.	PZT ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	37
Resim 5.	Sekans işlemi sonrası gönderilen kromatogram dosyası.....	38
Resim 6.	Sekans analizi ile tanımlanan türlerin dağılımı.....	43

KISALTMALAR

ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS:	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ARB:	Aside dirençli bakteri
BL:	Bronş lavaj
BAL:	Bronkoalveolar lavaj
BCG:	<i>Bacille Calmette-Guerin</i>
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDC:	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI:	<i>The Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EZN:	Erlich Ziehl-Neelsen
HIV:	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSP65:	<i>Heat-shock protein genes</i>
HRCT:	<i>High Resolution Computed Tomography</i>
LJ:	<i>Löwenstein-Jensen</i>
MAK:	<i>Mycobacterium avium</i> kompleks
MGIT:	<i>Mycobacteria growth indicator tube</i>
MTBK:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks
NALC:	N-Asetil-L-Sistein
NaOH:	Sodyum hidroksit
NAP:	<i>p-nitro-α-acetylamino-β-hydroxypropioiphenone</i>
OT:	<i>Old tuberculin</i>
PPD:	Pürifiye protein deriveleri
PRA:	Polimeraz Zincir Tepkimesi -Restriksiyon Enzim Analizi
PZT:	Polimeraz Zincir Tepkimesi
RE:	Restriksiyon enzimi
RFLP:	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SSCP:	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
TDM:	Tüberküloz Dışı Mikobakteri
TNF:	Tümör nekrozis faktör

1. ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Dizi Analizi İle Tanımlanması

Dr. Selçuk TÜRKEL, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, 2013

Geçmişte hastalık etkeni olarak değerlendirilmeyen Tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM), günümüzde bağışıklık sistemini baskılayan hastalık ve tedavilerin artmasına bağlı olarak giderek artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak izole edildiği görülmektedir. TDM'lerin oluşturdukları klinik tablolar ve tedavi protokolleri çok çeşitlilik gösterdiğinden tür düzeyinde tanımlanmaları gerekmektedir. Çalışmamızda, TDM'lerin tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilen DNA dizi analizi ile isolatların tür düzeyinde identifiye edilmesi amaçlanmıştır.

2004-2010 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında solunum yolu örneklerinden izole edilmiş olan 156 adet TDM izolatu LJ besiyerine pasajlanarak üretildi. DNA ekstraksiyonlarının ardından 65-kDa luk ısı şok proteinini kodlayan hsp65 gen bölgesinin 441 bp uzunluğundaki parsiyel bölgesi polimeraz zincir tepkimesi ile çoğaltıldı. hsp65 gen sekanslaması hizmet alımı ile gerçekleştirildi. Elde edilen DNA dizileri Genbank'tan indirilen referans mikobakteri hsp65 gen bölgesi dizileri ile karşılaştırılarak hizalandı. Hizalanmış DNA dizileri, BLAST programı ile analiz edilerek 156 adet izolat tür düzeyinde tanımlandı.

Referans diziler ile karşılaştırılan isolatlardan 37'si %100, 111'i %99, dördü %98 ve birer tanesi ise %97, %95, %93 %90 uyumluluk ile tanımlandı. Çalışmaya alınan 156 izolatu tamamı hsp65 gen bölgesi sekans analizi ile belirlendi. Çalışmada 13 farklı TDM türü ve 2 farklı *Nocardia* türü olmak üzere, toplam 15 farklı tür saptandı.

En fazla izole edilen TDM türü 69 (%44,2) adet ile *M.abscessus* oldu. Bunu sırasıyla 26 (%16,7) izolat ile *M. xenopi*, 17 (%10,9) izolat ile *M.peregrinum*, 13 (%8,3) izolat ile *M. fortuitum*, 6 (%3,8) izolat ile *M. intracellulare*, 5 (%3,2) izolat ile *M.simiae*, 5 (%3,2) izolat ile *M. lentiflavum*, 3 (%1,9) izolat ile *N.cyriacigeorgica*, 3 (%1,9) izolat ile *M.avium*, 2 (%1,3) izolat ile *N. abscessus*, 2 (%1,3) izolat ile *M. chelonae*, 2 (%1,3) izolat ile *M. bolletii* ve birer (%0,6) adet olmak üzere *M. senegalense*, *M. porcinum* ve *M. kansasii*'nin takip ettiği belirlendi.

Sonuç olarak TDM türlerinin tanımlanmasında hsp65 gen bölgesinin parsiyel DNA dizi analizinin yeterli ve başarılı olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Tüberküloz dışı mikobakteri, DNA dizi analizi, hsp65

2. SUMMARY

Identification of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens by sequence analysis

Dr. Selçuk TURKEL, Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, 2013

Non-tuberculous mycobacteria (NTM), which was not accepted to cause disease in the past, has been observed to be isolated as an infection agent in increasing frequency in accordance with the rise in diseases and treatments that suppress immune system. Clinical syndromes that caused by NTM and their treatment protocols varies widely, therefore it is essential to be identified of NTM in species level. In our study, it is aimed to identify isolates in species level by DNA sequence analysis which is accepted as a gold standard in identification of NTM's.

156 NTM isolates have been grown on LJ medium, which were isolated from the respiratory tract specimens in Central Laboratories of Dokuz Eylul University Hospital, between 2004 and 2010. Four hundred and forty-one -bp fragment of the hsp65 gene encoding the 65-kDa heat shock protein was amplified by polymerase chain reaction after DNA extraction. Hsp65 gene sequencing has been accomplished by service procurement. DNA sequences have been aligned in accordance with the hsp65 gene sequences of reference mycobacteria at Genbank. Aligned DNA sequences have been analyzed by BLAST software and 156 isolates have been identified in species level.

Within isolates which were compared with reference sequences, 37 of them have been identified with 100% compatibility, whereas 111 of them have been identified with 99% compatibility, four of them with 98%, and remaining four isolates have been identified with 97%, 95%, 93% and 90% compatibilities. A total of the 156 isolates in the study have been identified by hsp65 sequence analysis. In the study, 15 different species have been detected 13 of which belong to NTM and 2 to *Nocardia*.

The most frequently isolated NTM species was detected as *M. abscessus*; 69 of which were isolated (44,2%). The rest of the results were obtained as follows; 26 isolates for *M. xenopi* (16,7%), 17 isolates for *M. peregrinum* (10,9%), 13 isolates for *M. fortuitum* (8,3%), 6 isolates for *M. intracellulare* (3,8%), 5 isolates for *M. simiae* (3,2%), 5 isolates for *M. lentiflavum* (3,2%), 3 isolates for *N. cyriacigeorgica* (1,9%), 3 isolates for *M. avium* (1,9%), 2 isolates for *N. abscessus* (1,3%), 2 isolates for *M. chelonae* (1,3%), 2 isolates for *M. bolletii* (1,3%) and one isolate for *M. senegalense*, *M. porcinum* ve *M. kansasii* (0,6%) in order.

As a result, hsp65 gene region's partial DNA sequence analysis have been determined to be sufficient and succeeding at identification of NTM species.

Keywords: Non-tuberculous mycobacteria, DNA sequence analysis, hsp65

3. GİRİŞ VE AMAC

Tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen tüberküloz hastalığı hala en önemli enfeksiyon hastalıklarından birisidir. Günümüzde sadece az gelişmiş ülkelerin değil gelişmiş ülkelerin de en büyük sorunlarından birisini oluşturan tüberküloz bütün dünyada yaygın olarak görülmekte ve önemini korumaktadır(1).

Mikobakteriler hayvanlarda ve insanlarda hastalık oluşturabilen ve çevrede yaygın olarak bulunan 100'den fazla tür içerir(2). Bunlardan bazıları hayvan ve insanlarda enfeksiyona yol açarken, bazıları da potansiyel patojendirler. Geri kalan birçok mikobakteri türü ise doğada özellikle toprak, su kaynakları ve içme suyu sistemlerinde saprofit olarak bulunmaktadır(3). Bu genus içerisindeki *Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışında kalan mikobakteriler Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM), non-tüberküloz mikobakteriler (*Mycobacteria other than tuberculosis* = MOTT) veya atipik mikobakteriler olarak adlandırılmaktadır(4).

Önceki yıllarda hastalık etkeni olarak kabul edilmeyen TDM'lerin hastalık oluşturdıkları 1950 yılında Timpe ve Runyon tarafından kanıtlanmıştır(5). TDM'ler son yıllarda bağışıklık sistemin baskılanmasına neden olan tedavilerin yaygınlaşması ve AIDS sıklığının artmasına bağlı olarak giderek artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak izole edilmektedir. TDM'ler büyük oranda klasik antitüberküloz ilaçlara dirençlidirler. Klasik tüberküloz ilaçlarına büyük oranda dirençli olmaları ve giderek artan sıklıkta izole edilmeleri nedeniyle TDM enfeksiyonlarının doğru ve erken tanısı tedavi başarısı açısından çok önemlidir(6).

TDM enfeksiyonlarının klinik tanısı zor olup, etkenin tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan klasik biyokimyasal testler zahmetli ve uzun süre gerektiren yöntemlerdir(7). Bu süreç sonunda sadece belli türler tanımlanabilmektedir. Tüm mikobakteri izolatlarının yaklaşık %14'ü fenotipik yöntemlerle tanımlanamamaktadır(8). Bu nedenle son yıllarda TDM'lerin tanısında hızlı ve güvenilir moleküler yöntemler tercih edilmektedir(9). Spesifik DNA problemleri, polimeraz zincir tepkimesi restriksiyon enzim analizi ve DNA dizi analizi kullanılan başlıca moleküler yöntemlerdir(10). Bu yöntemlerden biri olan DNA dizi analizi diğer moleküler yöntemlere göre daha ayrıntılı bilgi verir ve mikobakterilerin tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir(6,11).

Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında genellikle 16S rRNA, hsp65, recA, sodA, gyrB, rpoB, 16S-23S rRNA ITS gibi gen bölgeleri hedef alınmaktadır(12). En sık kullanılan iki gen bölgesi 16SrRNA ve hsp65 gen bölgeleridir(9). Tanımlama amaçlı

kullanılan hsp65 geni mikobakteri türleri arasında yüksek oranda korunmuştur ve tür tanımına olanak sağlayan çok değişken bölgeler içerir(12,13).

Bizim çalışmamızın amacı Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına 2004-2010 yılları arasında gönderilmiş solunum yolu örneklerinden izole edilen 156 adet TDM izolatının hsp65 gen bölgesi hedef alınarak yapılan DNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlanmasını sağlamaktır. Bu çalışma ile hastanemizdeki epidemiyolojik durumun saptanması yanı sıra TDM izolatlarının tanımlanması için hsp65 gen bölgesinin DNA dizi analizinde seçilmesinin uygun olup olmadığı da değerlendirilecektir. Ayrıca tanımlanan TDM'lerin farklı tanı testlerinin duyarlılığının ve özgüllüğünün belirlenmesinde kullanılabilecek olması da ek bir fayda sağlayacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Terminoloji

Mycobacterium cinsi, *Mycobacteriaceae* ailesinin tek üyesidir. Bu aile, *Prokaryot* aleminin, *Firmicutes* bölümünün, *Actinobacteria* sınıfının, *Actinomycetales* takımındadır. Mikobakteriler hücre duvarında bulunan lipit tabakası nedeniyle kolay boyanmazlar ve içlerine aldıkları boyayı da asit alkol ile yapılan dekolorizasyona rağmen bırakmazlar. Bu nedenle aside dirençli bakteriler olarak isimlendirilirler(14).

Pinner, 1935 yılında mikobakteri türlerine nasıl bir genel isim verilmesi gerektiği konusunda ilk çalışmaları başlatan araştırmacıdır. *M. tuberculosis* ve *M. leprae* suşlarına benzemeyen mikobakteri türlerini hayvanlarda hastalık oluşturabilme, koloni morfolojisi ve besiyerinde pigment oluşturma özelliklerine göre “atipik aside dirençli mikroorganizmalar” diye adlandırmıştır(15). Daha sonra taksonomi alanındaki çalışmalar devam ettikçe atipik olarak adlandırılan türlerin gerçekte, kendi türüne özgün tipik özellikler taşıyan türler olduğu görülmüştür. Bu nedenle *M. tuberculosis* türünü referans alıp diğer türler için atipik tanımının doğru olmayacağı görüşü benimsenmiştir. *M. tuberculosis* dışında kalan mikobakteriler için “Mycobacteria other than tubercle bacilli” (MOTT) veya “nontuberculous” mikobakteri (NTM) tanımları kullanılmıştır(4,15). Atipik mikobakteri türlerinin bazılarının da (*M. avium*, *M. kansasii*) *M. tuberculosis* gibi akciğerlerde tüberkül oluşturarak benzer klinik tabloya neden olmasından dolayı Wayne ve Sramek, 1992 yılında MOTT ve NTM tanımlarının da tam doğru olmadığını savunmuşlardır. Tüberküloz dışı mikobakterilerin çok nadiren kişiden kişiye bulaşmaları, doğada serbest yaşayabilmeleri ve fırsatçı hastalık etkeni olmaları sebebiyle “Potansiyel Patojen Çevresel Mikobakteri” tanımının daha uygun olacağını bildirmişlerdir. Bu nedenle MOTT tanımını “Mycobacteria other than tubercle bacilli” yerine “Mycobacteria other than *M. tuberculosis* complex” olarak değiştirmişlerdir(16).

Günümüzde, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışında kalan mikobakteriler Tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM), non-tüberküloz mikobakteriler (Mycobacteria other than tuberculosis = MOTT) veya atipik mikobakteriler olarak adlandırılmaktadır(4).

4.2. Tarihçe

İnsanların mikobakterilerle karşılaşmasının kanıtları M.Ö. 8000 yıllarına dayanır. Toplu yaşama geçiş ve sığırların evcilleştirilmesiyle tüberküloz hastalığı gelişmiştir. Bu dönemle ilgili olarak, Almanya’da bulunan insan iskeletlerinde (M.Ö. 5000) aside dirençli

basil (ARB) saptanmıştır. M.Ö. 3500-3000 yıllarına ait Mısır mumyaları ve Ürdün’de bulunan insan iskeletlerinde de tüberküloz hastalığını düşündüren (Pott hastalığı ve Psoas apseleri) bulgular görülmüştür. Mısır’da Nil yakınlarındaki bir mezarda bulunan ve M.Ö. 1500 yıllarına ait belgede, scrofula (sıraca-Lenf bezi tüberkülozu) yer aldığı bildirilmektedir(17).

Yaklaşık 1500’lü yıllardan itibaren tüberkülozun insandan insana bulaşabileceği düşüncesi varolduğu halde deneysel olarak gösterilememiştir. Jean Antoine Willemin, 1865 yılında Paris Tıp Akademisi’nde yaptığı sunumda “Tüberkülozun sebebi bir mikrop, bir germdir, bu hastalık mikrobunu, hastalandırıldığı dokularda bulunmaktadır ve burada çoğalarak hastalığa sebep olmaktadır” demiştir(18). Bu tarihten sonra Robert Koch 1882’de tüberküloz basiliyi keşfetmiş ve 1905 yılında tüberküloz çalışmaları nedeniyle Nobel ödülü almıştır(19). Koch 1884’de klinik örneklerden basili izole ederek saf kültürünü üretmiş, deneysel olarak hayvanlarda hastalık oluşturmuş ve enfekte hayvanlardan bakteriyi yeniden üreterek “Koch postülası” nı ileri sürmüştür. *Bacterium tuberculosis* adı ile anılan bakteri, koloni morfolojisi ve yavaş üreme özelliği nedeni ile mantara benzetildiğinden Lehman ve Neuman tarafından 1886 yılında *Mycobacterium tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir(20).

Mikobakteriler hakkında yapılan çalışmalarda ilk dönem 1880’de başlamış ve 1980 yılının sonlarına kadar sürmüştür. Özellikle 1950’lere kadar *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) ve *M. leprae* dışındaki mikobakterilerin insanda geçici kolonizasyona sebep oldukları düşünülmekteydi. 1950’de “in vitro” karakterlerine göre atipik mikobakteriler olarak sınıflandırılmış ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda sık görülen önemli enfeksiyonlar oluşturdukları Timpe ve Runyon tarafından ortaya konulmuştur(21,22). Daha sonraki yıllarda mikobakteri enfeksiyonlarının yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmeye başlamasıyla bu bakterilerin klinik önemi daha da artmış ve bu konuda daha fazla çalışma yapılmıştır. 1960’lı yıllarda hücre duvar yapısı ile ilgili çok önemli bilgiler elde edilmiştir. Ancak, gelişmiş ülkelerde bu enfeksiyonların yaygın olmaması ve teknolojik yetersizlikler nedeniyle bu konu hakkındaki çalışmalara ara verilmiş ve bu çalışmalar önceliğini yitirmiştir(21).

1980’lerden sonra mikroskop alanında sağlanan gelişmeler sonucunda mikobakterilerin hücre yapısıyla ilgili daha detaylı bilgiler elde edilmiştir. Bunun yanında moleküler genetik alanındaki ilerlemeler sonucu önemli patojen türlerin gen analizleri yapılarak mikobakterilerin yapıları ve metabolizmaları ile ilgili daha detaylı çalışmalar yeniden hız kazanmıştır. AIDS ve organ nakil hastalarının insidansındaki artış, steroid ve

kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların yaygın kullanımı TDM enfeksiyonlarının görülme sıklığının artmasına neden olmuştur. Sonraki yıllarda çeşitli çalışmalarda birçok TDM türünün bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların yanısıra, sağlıklı bireylerde de ciddi enfeksiyonlara yol açtığı saptanmıştır(23).

Mikobakterilerin tanımlanmasında 1980'li yıllara kadar fenotipik özelliklerin değerlendirildiği klasik testler kullanılmaktaydı. Günümüze kadar olan süreçte, moleküler çalışmalardaki ilerlemelerin etkisiyle genotipik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Günümüzde mikobakterilerin identifikasyonu yapılırken hem fenotipik, hem de genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır. Böylece daha doğru, hızlı ve kesin sonuç verebilecek testlerin kullanılması tedavinin doğru yönlendirilmesine büyük katkı sağlamaktadır(4,24).

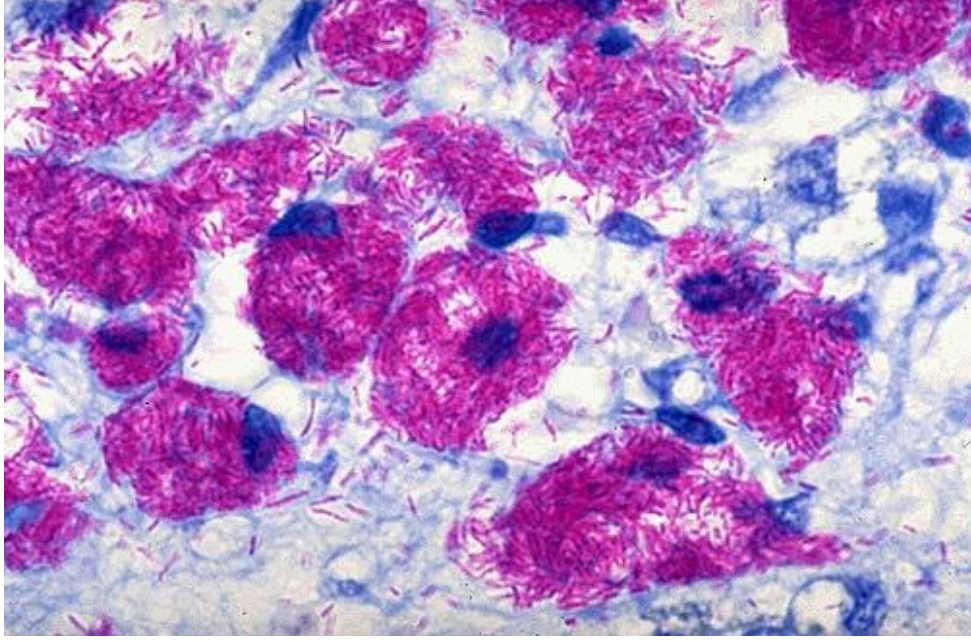
4.3. TDM'lerin Mikrobiyolojik Özellikleri

4.3.1. Genel Özellikler ve Hücre Duvarı Yapısı

Mikobakterilerin tüm üyeleri aerob, hareketsiz, spor oluşturmeyen ince, bazen hafif kıvrık veya düz, 0,2-0,6 µm eninde, 1,0-10 µm boyunda olan bazen filamentöz formda bazen de kokobasil şeklinde olabilen basillerdir(20). Aside-alkole dirençli özellik gösterirler. Uyumsuz koşullarda ve eski kültürlerinde daha uzun ya da ipliksi değişik morfolojide çomaklar olarak görülebilirler(25).

Diğer bakterilerin hücre yapısı ile mikobakterilerin hücre yapısı benzer özellikler gösterir. Esas fark hücre duvar yapısı ve bazı kimyasal özelliklerdir. Gram negatif bakterilerden farklı olarak, mikobakteri hücre duvarının üzerinde bir dış zar bulunmaz. Yapısal olarak gram pozitif bakterilere daha yakın olmasına rağmen, mikobakterilerin hücre duvarında protein ve polisakkaritler yerine özellikli lipidler yer almakta, bu nedenle gram pozitif kategorisine de uymamaktadır. Sıklıkla kristal viyoleyi tutamazlar ve gram boyamada hayalet hücreler şeklinde görülürler. Mikobakterilerin yüksek yağ içerikli hücre duvarı, fenol ile kombine edilmedikçe anilin ve diğer suda çözünen boyalara geçirgen değildir. Ehrlich'in, tüberküloz basilinin aside dirençli oluşunu keşfetmesi ile patolojik örneklerde basilin belirlenmesinde çok büyük kolaylık sağlanmıştır. Aside dirençlilik, bazı mikroorganizmaların karbol fuksin gibi arilmetan boya ile boyandıktan sonra asit-alkol renksizleştirmesine direnç göstermesi olarak tanımlanır(25).

Resim 1. Mikobakterilerin Erlich Ziehl Neelsen boyama görüntüsü(26).

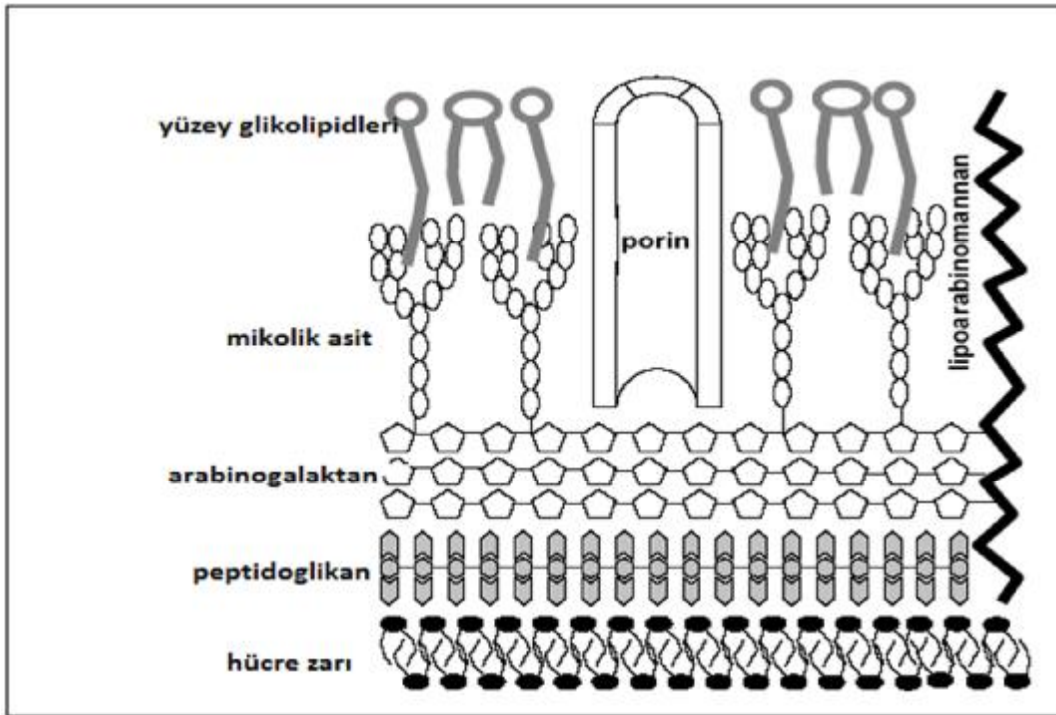


Mikobakterilerin hücre duvarı iç, orta ve dış tabaka olmak üzere üç bölümden oluşmuştur. İç tabakada çift sıra fosfolipid olan plazma membranı vardır ve diğer bakterilerin plazma membranları ile benzer özellikler taşır. Plazma membranı, fosfatidil inositol mannozid ve lipoarabinomannan ile hücre duvarına sıkıca bağlıdır. Lipoarabinomannan, hücre zarından başlayıp hücre duvarının dışına kadar uzanan ve işlevsel olarak diğer bakterilerde bulunan O yüzey antijeni yapısındaki lipopolisakkaritler ile ilişkilidir(27). Orta tabaka periplazmik boşluk sayesinde dış tabakadan ayrılır. Bu tabakanın yapısında peptidoglikan, arabinogalaktan ve lipidler bulunmaktadır. Peptidoglikan yapı bakteriye şeklini verirken, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır(25,28).

Hücre duvarının %35'ini oluşturan arabinogalaktan tabaka, immunojen özelliğe sahiptir ve mikolik asitlerle birbirine bağlanmıştır. Peptidoglikan tabakaya D-arabinoz ve N-asetil muramik asit arasında kurulan fosfodiester köprüleriyle bağlıdır(25,28). Mikolik asitler, dış tabakaya kadar uzanan alfa dallanma gösteren beta hidroksillenmiş büyük yağ asitleridir. Bu yapı mikobakteriler dışında, *Corynebacterium*, *Gordona*, *Nocardia*, *Tsukamurella* ve *Rhodococcus* türlerinin hücre duvarında da bulunmaktadır(29). Mikolik asitler ilk olarak 1929 yılında Anderson tarafından *M. tuberculosis* suşlarında gösterilmiş ve 1950 yılında Asselineau tarafından ayrıntılı şekilde tanımlanarak moleküler yapısı formüle edilmiştir(30,31).

Mikolik asitler mikobakterilerde hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini, hücre duvar lipitlerinin de %60'ını oluştururlar. Bu yapı hücre duvarına hidrofobik bir bariyer özelliği kazandırır. Lipidden zengin hücre duvarına sahip olmaları nedeniyle mikobakteri türleri gram boyama ile iyi boyanmazlar. Erlich-Ziehl Neelsen (EZN) boyama esnasında bu bakteriler almış oldukları boyayı asit alkole rağmen bırakmazlar. Bu hücre duvar özellikleri, “aside ve alkole dirençli bakteriler” olarak tanımlanmalarını sağlamaktadır. Hücre duvarı sayesinde mikobakteriler vücutta her türlü saldırıya karşı korunurlar ve bu sayede konağın immün cevabını da etkileyerek asemptomatik taşıyıcılıktan, kronik granülomatöz hastalıklara, tedaviye cevap vermeyen yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlara kadar değişen klinik tablolara yol açarlar. Yapıda bulunan mikolik asitler ve glikolipid yapısındaki lipoarabinomannan antijenik özellik taşımaktadır(25,28,29).

Resim 2. Mikobakterilerde hücre duvar yapısı(32).



Hücre duvarının en dış tabakası ise serbest lipidlerin yer aldığı bölümdür. Bu kısım in vitro şartlarda mikroskopla görülemeyen ve kapsüle benzer bir yapıdır. Bu yapı içerisinde, α -1,4 glukan, arabinomannan ve mannan içeren lipomannan, lipoarabinomannan gibi kapsüler polisakkaritler ve az miktarda lipid bulunur. Bu yapının bakteri virülansında görevi vardır. Mikobakterilerin hücre duvarında seyrek de olsa gram negatif bakterilerde görülen porin proteinleri de bulunur(25,28).

Mikobakterilerin lipid, protein ve polisakkaritlerden oluşan antijenleri vardır. Bunlardan “old tuberculin” (OT), Robert Koch tarafından bulunan ve tüberkülin deri testinde kullanılan ısıya dayanıklı bir proteindir. OT’nin saflaştırılması ile elde edilen pürifiye protein derivesi (PPD), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün de önerisiyle tüberkülin deri testinde kullanılmaktadır. Kord faktörü, mikolik asitlerin trehaloz gibi şekerlere bağlanması ile (6-6’-dimikolat- α -D-trehaloz) meydana gelir ve bakterinin virulansı ile ilgilidir. Kültürden hazırlanan preparatlarda bakterinin demetler halinde bir arada bulunmasından sorumlu olduğu gibi, lökosit migrasyonunu önleme ve granülom oluşumunu stimüle etme gibi fonksiyonlara da sahiptir. Sulfolipidler (trehaloz 2 sulfat), bakterinin hücre içinde canlı kalmasından ve kord faktörle sinerji oluşturmamasından sorumludur. Isı şok proteinlerinin (65Kda, 38Kda, 12Kda), koruyucu immünite gelişmesinde ve komplikasyonlarda rolü olduğu düşünülmektedir(29).

4.3.2. Üreme Özellikleri

Birçok TDM türü basit substratların varlığında üreyebilir. TDM’ler amonyak kaynağı olarak amino asitleri, nitrojen kaynağı olarak tuzu, karbon kaynağı olarak da gliserolü kullanırlar. Daha az olmakla birlikte bazı türler demire gereksinim duyarlar. Üremeleri ortamda bulunan %10-20’lik karbondioksit ve yağ asitleri ile artarken, albüminle inhibe olur. Aeropturlar ama mikroaerofilik ortamlarda daha iyi ürerler. Optimum üreme ısıları 30-45 °C aralığındadır. Bölünme sürelerinin 12-18 saat olması nedeniyle diğer bakterilere oranla kültürlerinde yavaş ürerler. Katı ortamda bakterilerin üreyebilmeleri türden türe değişim gösterirken bazı türler için en az 3-7 gün, bazı türler için ise 6-8 hafta gereklidir(20,23,29). Üremeleri için katı ve sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. TDM’ler, MTBK için kullanılan besiyerlerinde rahatlıkla ürerken bazı türler için ortama katılan hemoglobin, ferrik amonyum gibi maddeler üremeyi arttırmaktadır(20). Mikobakterilerin kültürde oluşturdıkları kolonileri pigmentli ve pigmentiz olmakta, keratinoit pigment nedeniyle koloniler sarı, turuncu, nadiren pembe renkte görülebilmektedir. Bazı türler ise pigment oluşumu için ışığa ihtiyaç duymaktadır(29,33).

4.3.3. TDM’lerin Genetik Özellikleri

Mikobakterilerle ilgili yapılan genetik çalışmaların hız kazanması *M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. leprae* türlerinin gen analizleriyle başlamıştır. Bu çalışmalar sonucunda mikobakterilerin fizyolojik, biyokimyasal, patojenik ve genetik özellikleri hakkındaki bilgilerimiz daha da artmış, bu bilgilerin ışığında yeni tedavi ve profilaksi protokolleri geliştirilmeye çalışılmıştır(25,34). TDM’ler ile ilgili genetik çalışmalar yakın tarihe kadar

M. avium kompleks (MAK) üyeleri ve hızlı üreyen mikobakterilerle sınırlı kalmıştır. Bu çalışmalara göre mikobakterilerin büyük bir genomu sahip olduğu görülmüştür(35). Mikobakterilerin kromozom yapısı, çift iplikli çembersel DNA molekülünden oluşmakta ve yaklaşık olarak 1.3×10^9 baz çifti (bp) büyüklüğündedir. Guanin ve Sitozin (G+C) içeriği %60-71'dir. DNA dizi analizine göre birçok mikobakteri türünün genomu, G+C'den zengin kısa dizilerden oluşmaktadır(20,25). Mikobakteri genomunda %59 replikasyon, %30 lipid sentezi ve %10 protein sentezi ile ilgili genler bulunmaktadır. Ayrıca "noncoding" diziler, "insertion" dizileri ve mikobakteriler için özel olan, tekrarlayan üniteleri kodlayan gen bölgeleri de ortaya konulmuştur. *Escherichia coli*'de 7 adet rRNA operonunun olmasına karşılık mikobakteri geninde bir tane rRNA operonu olması, mikobakterilerin protein sentezini ve büyüme oranını sınırlayarak, yavaş üremelerine neden olmaktadır(25). Mikobakterilerde genom haricinde çeşitli özellikler taşıyan kromozom dışı DNA, plazmid, transpozon ve mikobakteriofaj gibi yapılar da bulunmaktadır(36).

Mikobakterilerin moleküler yöntemlerle tanımlanmasında en yaygın olarak kullanılan hedef gen bölgesi, 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgesidir. TDM'lerin yavaş üreyen türlerinde tek tip 16S rRNA gen kopyası bulunurken *M. chelonae* ve *M. abscessus* haricindeki hızlı üreyenlerde iki kopya bulunmaktadır. Bu özellik, dizi analiziyle tanımlanmaya çalışılan mikobakteriler arasında ayırım yapılamadığı zaman her iki kopyanın dizi analizinin yapılmasını gerektirir(35,37). Mikobakteriler diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında, genetik olarak birbirlerine çok daha yakın türlerdir ve 16S rRNA genindeki sadece 10-15 nükleotidin türler arasında farklılık oluşturduğu görülmektedir(38,39). Nükleotid farklılığının türler arasında bu kadar az olması birbirlerine yakın benzerlikteki türlerin ayırımında çeşitli zorluklara neden olmaktadır. 16S rRNA gen bölgesinin haricinde farklı hedef gen bölgeleri de kullanılmaktadır. Mikobakterilerin tür ayırımında 16S rRNA gen bölgesinin yanında en sık kullanılan bölge hsp65 gen bölgesidir. Hsp65 gen bölgesi mikobakterilerde bulunan, iyi korunan, türler arasında farklılıklar içeren bir bölgedir. Bu bölge, bakterilerin çevresel etkilerin oluşturduğu stres karşısında salgıladıkları 65-kDa ağırlığındaki ısı şok proteinini kodlamaktadır. Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları için farklı metotlar kullanılarak bu bölgenin dizilerinden faydalanılmaktadır(13,38).

4.4. TDM'lerin Sınıflandırılması

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri nedeniyle birbiriyle çok yakın ilişkili olan "*Mycobacterium tuberculosis* kompleks" içinde; *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (*M. bovis* subs. *bovis*, *M. bovis* subs. *caprae* ve *M. bovis* subs. *BCG*), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii* ve *Mycobacterium pinnipedii* bulunmaktadır. *M. tuberculosis* kompleks dışında kalan tüm mikobakteriler TDM olarak adlandırılmaktadır(29,40).

TDM'lerin; fakültatif patojen olmaları, insandan insana geçişi konusunda yeterli kanıt olmaması, türüne ve neden olduğu hastalığa bağlı olarak tedavilerinin zor ve farklı olması, mikroorganizma ve konağın bağışıklık sistemi arasındaki ilişkiye bağlı olduğu düşünülen hastalık patogenezinin belirsizliği, ortak özellikleridir(41).

Mikobakterilerin sınıflandırılmasıyla ilgili ilk çalışmalar 1950'lerde Timpe ve Runyon tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacılar 1954 yılında mikobakterilerin üreme süresi, koloni özelliği ve pigment üretim özelliklerine göre TDM'leri fotokromojenler, skotokromojenler, fotokromojen olmayanlar (Nonkromojenler) ve hızlı üreyenler olarak dört gruba ayırmışlardır(14,20,23). Grup I, II, III'ün kolonileri gözle görülür hale gelebilmesi için yedi gün veya daha fazla süreye ihtiyaç duyarken, Grup IV'ün kolonileri yedi günden daha kısa sürede gözle görülür hale gelmektedir(29).

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 R	Yavaş	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. simiae</i>
Grup II Skotokromojen	Karanlıkta ve ışıktaki pigmentli	S/R	Yavaş	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. flavescens</i>
Grup III Nonkromojen	Karanlıkta ve ışıktaki pigmentlessiz	S/R	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 pigmentlessiz	Genellikle S	Hızlı	<i>M. fortuitum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. chelonae</i>

				<i>M. abscessus</i> <i>M. simematis</i> <i>M. vaccae</i>
--	--	--	--	--

Runyon sınıflaması mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bazı türlerin tanımlanmasında güçlüklerle karşılaşmaktadır. Örneğin klinik önemi son yıllarda ortaya çıkan *M. kansasii*, genellikle fotokromojen olmakla birlikte, bazı suşlarının pigment oluşturmaması ve hatta skotokromojen olması, yine bazı *M. avium- intracellulare* suşlarının pigment yapması, *M. szulgai*'nin 37°C'de skotokromojen, 25°C'de fotokromojen olması Runyon sınıflamasına uymamaktadır. Bu sınıflama günümüzde iyi bir taksonomik standardizasyon için uygun olmasa da; klinik yaklaşım ve identifikasyon kolaylığı nedeniyle klinik mikrobiyoloji laboratuvarları TDM'lerin ön tanımlamasında bu sınıflamadan yararlanmaktadır(14,23,28).

TDM'lerin bir başka sınıflandırılması da etkenlerin klinik özelliklerine göre Wolinski tarafından yapılmıştır. Bu sınıflama, 1987 yılında Woods ve Washington tarafından TDM'lerin üreme özellikleri ve insanda hastalık oluşturup oluşturmamalarına göre yeniden düzenlenmiştir(14,29,33).

Tablo 2. Woods ve Washington sınıflaması

İnsanlarda Potansiyel Patojen Olan Mikobakteriler	İnsanlarda Nadiren Patojen Olan Saprofit Mikobakteriler
<i>M. kansasii</i> <i>M. avium-intracellulare</i> kompleks <i>M. fortuitum-chelonae</i> kompleks <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. marinum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. genavense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. celatum</i>	Yavaş Üreyenler <i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae-triviale</i> kompleks <i>M. gastri</i> <i>M. shimoidei</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. phlei</i> <i>M. parafortuitum</i> kompleks

4.5. TDM'ler ve Çevre İlişkisi

Tüm dünyada çevrede yaygın olarak bulunmakla birlikte, TDM'lerin büyük çoğunluğu (*M. ulcerans*, *M. haemophilum*, *M. genavense* hariç) sıcak-soğuk su kaynakları, toz, toprak gibi doğal çevrede, süt ve diğer besin maddelerinde bulunabilmektedir. Bu mikobakterilerin, insanda, birçok evcil ve yabani hayvanda kolonize olabildiği veya hastalık yaptığı bazı çalışmalar sonucu ortaya konulmuştur(4,20,28,42,43). Su, özellikle MAK, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. simiae* ve *M. malmoeense* türleri için kaynaktır(29,35). Bu mikobakteriler, dezenfektanlara diğer bakterilere oranla dirençli olmaları ve hidrofobik özellik göstermeleri nedeniyle uzun süre sularda yaşayabilirler. Hızlı üreyen mikobakterilerin % 30-78'i topraktan izole edilmektedir. Bu mikobakterilerden olan *M. chelonae*, *M. fortuitum*, ve *M. abscessus* topraktan ve doğal su kaynaklarından izole edilebilen, bu nedenle nozokomiyal enfeksiyonlarla en çok ilişkisi olan mikobakterilerdir(43,44). TDM'lerin su sistemlerinde ve çevrede kolonize olmaları sonucu meydana gelen hastane enfeksiyonları, 20 yıldır giderek artan sağlık sorunu haline gelmiştir. Sulardan bulaşma veya cerrahi aletlerde kolonize olmaları sonucu bazı cerrahi enfeksiyonlara da neden olmaktadır(44,45).

Mikobakteriler basınçlı buharla sterilizasyona ve pastörizasyona duyarlıdır. UV'ye çok duyarlı, kuruluğa ve dondurulmaya dirençlidirler. TDM türleri dezenfektanlara, klor gibi bazı kimyasal maddelere diğer sporsuz bakterilere oranla daha dirençlidirler. Sodyum hipoklorit, %70'lik alkol, %5 fenol ve povidon-iyodin gibi dezenfektanlara ise duyarlıdır(28,43). Güneş ışığı almayan yerlerde haftalarca hatta aylarca canlı kalabilirler. Mikobakterilerin çevre koşullarına dayanıklılıkları, epidemiolojik ve klinik bakımdan önemlidir. Yapılan bazı çalışmalarda ev, hastane ve belediye tesislerinden alınan suların %10-95'inde TDM izole edilmiştir. Hastane sularında ev sularından daha fazla mikobakteri izole edilmiştir. TDM'lerin metal gereksinimine bağlı olarak çinko kaplı boru sisteminde kolaylıkla çoğalabileceği düşünülmektedir(40,44).

TDM'ler doğada yaygın olarak bulunmalarına karşın, insan için potansiyel patojen olabilenler, belirli coğrafik bölgelerde daha sık görülmektedirler. Bazı bölgelerde tüm mikobakteri enfeksiyonlarının %0,5'ini oluştururken bazı bölgelerde bu oran %35'i bumaktadır(14,20). TDM'ler çok geniş aralıktaki sıcaklık, pH, tuz oranı ve oksijen basıncı değerlerinde yaşayabilmeleri nedeniyle yaygın coğrafik dağılıma sahiptirler. Çevrede yaygın

olarak bulunmalarının diğ er bir nedeni ise, bu bakterilerin ağı r metal ve oksianyonlara karşı diğ er bakterilere oranla g oreceli olarak dirençli olmalarıdır(20,28,46).

4.6. TDM'lerin Epidemiyolojisi

Mycobacterium tuberculosis kompleks'in neden olduğu tüberküloz hastalığı geri kalmış ülkelerde yaygın olarak görülmekte iken, TDM'lerin neden olduğu hastalıklar daha çok sanayileşmiş ülkelerde görülmektedir. Çevremizde yaygın olarak bulunabilen TDM türlerine bağlı enfeksiyonların insidansı ve prevalansı hakkındaki bilgiler yakın zamandaki çalışmalara bağlıdır(24). HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) pozitif ve negatif hastalarda pulmoner ve ekstra pulmoner enfeksiyonlara yol a maları nedeniyle 1950'lerden sonra TDM'lerle oluşan enfeksiyonlar hakkında çalışmalar artmıştır(21,46). Sonraki yıllarda TDM'lerin insan ve hayvanlarda hastalık oluşturduğu ve bu hastalıklarda oynadıkları rolleri açıklayan pek çok çalışma yayınlanmıştır(35,46).

TDM'lerin neden olduğu hastalıklar daha çok gelişmiş ülkelerde, nadiren gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Tüberküloz insidansının düşük olduğu Amerika ve Avrupa  lkelerinde, immun yetmezlikli hastalarda, özellikle AIDS'lilerde TDM'lerin neden olduğu enfeksiyonların görülme sıklığı daha yüksektir(10,46). Amerika'da çoğu pulmoner enfeksiyon olmak üzere her yıl 2/100.000 TDM enfeksiyonu g r ld ğu ve prevalansın giderek arttığı bildirilmektedir. İncelenen  rnek sayısının artmasının yanı sıra, son yıllarda TDM enfeksiyonlarının tanısındaki gelişmelerin de bu artışa katkıda bulunduğu belirtilmektedir. Bu konuda ABD'de yapılmış istatistiksel çalışmada 1979-1980 yılları arasında izole edilen 3200 mikobakteri türünün 1/3'  TDM olarak tanımlanmıştır. Bunların %61'i MAK, % 19'u *M. fortitutum*, %10'u *M. kansasii* ve %10'u diğ er TDM'lerin oluşturduğu görülmüştür(47). Fransa'da TDM'lerin neden olduğu pulmoner hastalık oranları 2002 yılı için 0,73/100.000 olarak bulunmuştur. Kişiden kişiye bulaş görülmediği için ABD'de TDM'ler rapor edilmemektedir(48,49). HIV enfeksiyonu bulunmayan kişilerde TDM'ler ile oluşan en sık lokalize enfeksiyon, kronik akciğer hastalığıdır(50). Bunun yanı sıra servikal lenfadenit, deri enfeksiyonları ve nadiren yaygın enfeksiyon etkeni olabilmektedirler(35). ABD'de 1981-1983 yılları arasında yapılmış büyük bir çalışmada ise beyaz olmayan kadınlarda ve kırsal alanda yaşayanlarda TDM enfeksiyonu daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak TDM prevalansı 1,8/100.000 ve MAK prevalansı 1,1/100.000 olarak belirlenmiştir(51). Tüberküloz dışı mikobakterilerin solunum örneklerinden izolasyonu son on

yılda artmıştır. Kanada’da pulmoner örneklerden elde edilen TDM’lerin sıklığında 1997 yılından 2003 yılına kadar ortalama %8,4 artış saptanmıştır(52).

1993 yılından sonra yapılan çalışmalar daha çok AIDS hastalarını kapsamaktadır. HIV pozitif hastalarda TDM enfeksiyon riski yüksektir. Avrupa ve Amerika’da AIDS hastalarının %25-50’sinde TDM enfeksiyonu görülmektedir(35). Bu hasta grubunda en sık izole edilen TDM türünün MAK olduğu bilinmektedir. AIDS hastalarında görülen mikobakteriyel enfeksiyonların %20-40’ı yaygın MAK enfeksiyonu olup, %60 oranında gastrointestinal ya da solunum sistemi kolonizasyonu ile meydana gelmektedir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalardaki yaygın TDM enfeksiyonlarında sık görülen patojen türler MAK, *M. kansasii*, *M. chelonae* ve *M. haemophilium*’dur. Bu hastalarda deri ve eklem enfeksiyonları travma sonucu gelişirken AIDS hastalarında bir neden olmadan bu tür enfeksiyonlar gelişebilmektedir. CD4+ T lenfosit sayısı 100’den az olan hastalar eğer MAK için profilaksi almıyorsa her yıl için yaygın MAK enfeksiyonu gelişme riski %20 olarak bildirilmektedir(4,28,35,53).

TDM türlerinin dağılımı coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermektedir. *M. avium* kompleks bir çok bölgede baskın görülen türdür. *M. kansasii* Orta Amerika ve İngiltere’de nispeten daha sık görülürken, *M. xenopi*’nin neden olduğu hastalıklar; Kuzey Amerika, İngiltere ve Avrupa’nın bazı bölgelerinde sık görülmektedir. *M. malmoense*’nin neden olduğu hastalıklar İngiltere ve Kuzey Avrupa’da yaygın görülürken, ABD’de nadirdir. Türkiye’nin Batı Anadolu Bölgesi’nde yapılan bir çalışmada ise; *M. avium* kompleks, *M. abscessus* ve *M. kansasii*’nin en sık görülen türler olduğu bulunmuştur. Su ve toprak gibi çevresel koşullardaki baskın TDM türleri, bölgesel farklılıkların temelini oluşturmaktadır(54,55).

4.7. TDM’lerde Patogenez ve Virülans Özellikleri

TDM’ler fırsatçı patojenlerdir. Akciğer, deri, yumuşak doku, kemik, tendon ve eklem enfeksiyonlarına neden olurlar. Sıklıkla hastalarda bağışıklık sistemini baskılayan durumlar, travma veya cerrahi gibi altta yatan çeşitli nedenler olabilir. Moleküler tekniklerdeki gelişmelere paralel olarak TDM’lerin virülans özellikleri hakkındaki bilgiler giderek artmaktadır. Bu amaçla yapılan araştırmaların çoğu MAK üyeleri hakkında gerçekleştirilmiştir(35). TDM’lerin virülans faktörleri :

- Fagozom-lizozom birleşmesini ve asidifikasyonunu önleyebilmeleri,
- Serumda bulunan inhibitör maddelere direnç göstermeleri,

- Enfekte konak hücreler tarafından tümör nekrozis faktör (TNF) salınımını geciktirmeleri,
- Gastrointestinal epitel hücreleri içine girip çoğalabilmeleri,
- Makrofajlar için reseptör üretimi ve makrofajlar içinde replike olabilmeleri,
- *M. ulcerans*'ın sitotoksik aktiviteye sahip olması,
- Fenolik glikolipidlerin varlığı ve oksijen radikallerini ya da lenfoproliferatif yanıtları inhibe edebilmeleri olarak sayılmaktadır(20,35,46,56).

Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda, TDM türlerinin MTBK'den daha az virulansa sahip oldukları görülmüştür(20). TDM'ler vücuda gastrointestinal, solunum sistemi veya deriden doğrudan inokülasyonla girerler. Hastanın kliniği, bu basillerin vücuda invazyonla girmelerinden çok vücutta oluşturdukları immün reaksiyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. *M. ulcerans*'a karşı vücutun oluşturduğu cevap dışında diğer TDM enfeksiyonlarının histopatolojik bulgularını MTBK'den ayırmak güçtür(29).

4.8. TDM Enfeksiyonlarının Klinik Özellikleri

Daha önceden etken olarak değerlendirilmeyen TDM'ler, 1950'den bu yana hastalık etkeni olarak kabul edilmektedir. Çevremizde yaygın olarak bulunan TDM türleri özellikle bağışıklığı bozulmuş hasta sayısının da artmasıyla daha sık enfeksiyonlara neden olmaktadır. Günümüze kadar tanımlanan 100'ün üzerinde TDM türü içinde 25'den fazlasının, hem bağışıklık sistemi baskılanmış hem de normal olan konaklarda tüberküloz dışı enfeksiyonlara neden olduğu klinik örneklerden izole edilerek kanıtlanmıştır(45,46,57).

Çevresel kaynakların ve canlı konakların, insanlarda görülen enfeksiyonlarda rol oynadığı bilinmektedir. Doğada yaygın olmalarına karşın potansiyel patojen olan mikobakteri türlerinin çoğu belirli coğrafik bölgelerde daha yaygın olarak bulunurlar. Tüberkülozun aksine kentlerde ve sosyoekonomik durumu iyi olanlarda daha fazla oranda hastalık etkeni olarak görülürler. Bağışıklık sistemi bozukluğu gibi altta yatan hastalığı olanlar vakaların çoğunu oluşturur. İnsanda tüm mikobakteriyel enfeksiyonların %0,5-35'inde TDM'ler etken olarak izole edilmektedir(28,35,58). Bazı TDM türleri de deri ve mukozalarda kolonize olarak herhangi bir klinik tabloya neden olmazlar(59). Klinik örneklerden TDM'lerin izolasyonu enfeksiyon, kolonizasyon veya yalancı enfeksiyon olarak değerlendirilebilir.

M. kansasii, ve *M. intracellulare* türleri ile oluşan hastalıkların sıklığı, AIDS epidemisinden önce olduğu gibi sonrasında da aynı seviyede kalmış, ancak *M. avium* türünün

AIDS epidemisi ile birlikte sıklığında iki kat artış gözlenmiştir(60). Günümüzde MAK enfeksiyonları sağlıklı kişilerde ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda önemli bir patojen olarak karşımıza çıkmaktadır. *M. kansasii* AIDS'lilerde yaygın ve akciğer enfeksiyonu şeklinde iki tip enfeksiyon oluşturur. AIDS'li hastalarda yapılmış prospektif bir çalışmada; *M. haemophilum*'un böbrek nakli yapılmış hastalarda deri lezyonu, subkutanöz apseler, lenfadenit, yumuşak doku, kemik ve eklem tutulumundan yaygın hastalığa kadar değişen tablolara yol açtığı tespit edilmiştir(21,28,29). *M. scrofulaceum* çocuklarda servikal lenfadenit etkeni, *M. marinum* sıklıkla tatlı sularda, denizlerde, yüzme havuzları ve balık endüstrisinde çalışanlarda cilt enfeksiyonu etkenidir.

TDM enfeksiyonlarında sıklıkla lokalize organ bulguları, diare, anemi, kilo kaybı, iştahsızlık, halsizlik, miyalji ve ateş gibi semptomlar görülür(35). Runyon sınıflandırmasına göre olası etkenler ve neden oldukları hastalıklar Tablo 3'de özetlenmiştir(28,29,57,61,62).

Tablo 3. Runyon sınıflandırılması ve TDM'lerin en sık neden oldukları hastalıklar

Tür	Yaptıkları Hastalıklar
Grup I-Fotokromojenler	
<i>M. kansasii</i>	Akciğer enfeksiyonu, ekstrapulmoner lenf nodu, deri veya yumuşak doku, kemik, eklem, GÜS ve yaygın enfeksiyonlar
<i>M. asiaticum</i>	Akciğer enfeksiyonu
<i>M. marinum</i>	Deri ve yumuşak doku enfeksiyonu (yüzme havuzu granülomasi), tenosinovit ve yaygın enfeksiyonlar
<i>M. intermedium</i>	Akciğer enfeksiyonu
Grup II-Skotokromojenler	
<i>M. szulgai</i>	Akciğer enfeksiyonu, lenfadenit, deri, eklem ve yaygın enfeksiyonlar
<i>M. flavescens</i>	Artrit, lenfadenit, bakteriyemi
<i>M. scrofulaceum</i>	Lenfadenit, akciğer enfeksiyonu ve ekstrapulmoner tutulum
<i>M. interjectum</i>	Lenfadenit
<i>M. gordonae</i>	Diyaliz hastalarında peritonit, cerrahi enfeksiyonlar
<i>M. lentiflavum</i>	Akciğer ve eklem enfeksiyonu, lenfadenit, yaygın enfeksiyon
<i>M. xenopi</i>	Akciğer enfeksiyonu, nadiren yaygın hastalık, eklem enfeksiyonları
Grup III-Nonkromojenler	
<i>M. avium</i> kompleks	Akciğer enfeksiyonu, yaygın enfeksiyonlar, lenfadenit ve tenosinovit
<i>M. celatum</i>	Akciğer ve yaygın enfeksiyonlar
<i>M. genavense</i>	İmmünokompromize hastalarda deri enfeksiyonu, septik artrit ve AIDS'lilerde beyinde soliter apseler
<i>M. haemophilum</i>	Akciğer enfeksiyonu, immünokompromize hastalarda cilt, cilt altı veya eklemlerde, artrit, osteomyelit, sinüzit, lenfadenit, akıntılı, enfeksiyonlar ve bakteriyemi
<i>M. malmoense</i>	Pulmoner, servikal lenfadenopati, ve tenosinovit
<i>M. shimoidei</i>	Akciğer enfeksiyonu
<i>M. simiae</i>	Akciğer enfeksiyonu, osteomyelit ve renal tutulum

<i>M. ulcerans</i>	Akciğer enfeksiyonu, kronik deri ülserleri (Bairnsdale ülseri veya Buruli ülseri) ve cerrahi sonrası nozokomial enfeksiyonlar
<i>M. terrae</i> kompleks	Kronik eklem ve yara enfeksiyonları
Grup IV-Hızlı üreyenler	
<i>M. fortuitum</i> kompleks	Akalazyalı hastalarda akciğer enfeksiyonu, osteomyelit ve ortopedik implantlarla ilişkili enfeksiyonlar
<i>M. peregrinum</i>	Kronik akciğer enfeksiyonları, kemikve deri enfeksiyonu
<i>M. chelonae</i>	Yaygın cilt enfeksiyonları, akalazyalı hastalarda, ortopedik implantlarla ilişkili enfeksiyonlar ve akciğer enfeksiyonu
<i>M. abscessus</i>	Deri, eklem, lenfatik, akciğer enfeksiyonlar ve osteomyelit
<i>M. houstonense</i>	Akciğer, deri enfeksiyonu
<i>M. neoaur</i>	Deri, katater enfeksiyonu, bakteriyemi
<i>M. smegmatis</i>	Akciğer ve cild enfeksiyonları
<i>M.septicum</i>	Kateter enfeksiyonlarına bağlı bakteriyemi

Mikobakterilere bağlı nozokomial enfeksiyonlar birçok antimikrobiyal ilaca dirençli olmalarından dolayı gittikçe artan bir öneme sahiptir(28,40). TDM'lere ait nozokomial enfeksiyonlar, hastanede kalınan süre boyunca hastalarda gelişebileceği gibi virülansı düşük ve yavaş üreyen bakteriler olduklarından, hastaneden çıktıktan sonra da enfeksiyona yol açabilirler. Özellikle hızlı üreyen mikobakteriler, daha sıklıkla nozokomial enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Avrupa ülkelerinde ve ABD'de hastanelerin sıcak ve soğuk su dağıtım sistemlerinde yapılan sürveyans çalışmalarında, *M. xenopi* ve *M. avium* daha sıklıkla saptanmıştır. Yapılan çalışmalara göre Asya ve Avrupa'daki hastane sularında ev sularından daha fazla TDM izole edilmiştir(23,40). TDM'ler hastanelerin su depolama sistemlerinde bulunmaları ve musluk suyundan hastalara bulaşmaları ile nozokomial enfeksiyonlara veya yalancı enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. Yapılan çalışmalarda TDM'lerin hastanede yatan diyaliz hastalarında, enjeksiyon veya intravenöz tedavi alan hastalarda lokal apselere yol açarak nozokomial salgınlara neden oldukları gösterilmiştir. Hastanelerde kullanılan endoskop ve diyaliz cihazları gibi ekipmanlarda da bu bakteriler bulunabilmektedir. Böylece özellikle cerrahi hastalarında çeşitli enfeksiyon tabloları oluşturmaktadırlar(40). Moleküler yöntemler bulaş kaynağı konusunda izole edilen türlerin benzerliklerini ortaya koyma bakımından oldukça yararlıdır(29,40).

4.9. TDM'lerin Tanısı

Tüberküloz dışı mikobakterilerin neden olduğu akciğer hastalıklarının tanısında Amerikan Toraks Derneği tarafından klinik ve mikrobiyolojik kriterler belirlenmiştir.

Klinik olarak ;

- Pulmoner semptomlar, akciğer grafisinde; nodüler veya kaviter opasiteler olması, yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (High resolution computed tomography - HRCT) incelemesinde; birden çok küçük nodüller ile multifokal bronşektazi alanlarının izlenmesi
- Diğer klinik tanıların dışlanması

Mikrobiyolojik olarak ;

- En az iki ayrı balgam kültüründe TDM üremesinin saptanması, (eğer sonuç negatifse yeni balgam örneğinde ARB bakı ve kültürün yapılması düşünülmelidir) veya
- En az bir bronş lavaj (BL) veya bronş yıkama örneğinde kültürde TDM üremesinin saptanması veya
- Transbronşiyal veya diğer akciğer biyopsilerinde mikobakteriyel histopatolojik özellikler (granülomatöz inflamasyon ve ARB) ve kültürde TDM üremesinin saptanması, veya biyopsi materyallerinde mikobakteriyel histopatolojik özellikler ve bir veya daha fazla balgam veya BL örneğinden yapılan kültürde TDM üremesinin saptanması
- Çevresel kontaminasyona bağlı veya nadir rastlanan TDM'lerin üremesi saptandığında uzman görüşü istenilmelidir
- Tüberküloz dışı mikobakterilere bağlı akciğer hastalığı olduğundan şüphe edilen ancak tanı kriterlerine uymayan hastalar tanı kesin olarak konulana veya tamamen dışlanana kadar takip edilmelidir
- Tüberküloz dışı mikobakterilere bağlı akciğer hastalığı tanısı konulması her zaman tedaviye başlanmasını gerektirmez. Her hastaya sağladığı fayda ve potansiyel risklere göre tedavi kararı verilir.

Klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik kriterlerin her biri, TDM'ye bağlı akciğer hastalığı tanısı konulmasında eşit derecede önemlidir ve tanının konulması için tümünün uyumlu olması gerekir. Bu kriterler en çok MAK, *M. kansasii* ve *M. abscessus*'un neden olduğu akciğer hastalıklarına uymaktadır(48).

Tüberküloz dışı mikobakteri türlerinin doğru ve güvenilir olarak tanısının konulabilmesi ve epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesi için duyarlılığı ve özgüllüğü

yüksek, kısa sürede sonuç veren tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla hızlı kültür sistemleri ve moleküler yöntemler geliştirilmiştir.

4.9.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Mikobakterilerin mikrobiyolojik tanısının tam ve doğru olarak yapılabilmesi için klinik örnek uygun yerden, doğru zamanda ve yeterli miktarda alınmalı, uygun laboratuvar koşullarında işlenmelidir. Hastalık çok çeşitli organ ve dokuları tutabildiğinden örnek seçimine özen gösterilmelidir. Mikobakteriyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerin çoğunluğu solunum sistemi kaynaklı (ekspektore veya indüklenmiş balgam, açlık mide sıvısı, bronkoalveoler lavaj, transtrakeal aspirasyon, bronşial fırçalama ve laringeal sürüntü örnekleri) olmakta, idrar, gastrik aspiratlar, dokular, biyopsi örnekleri ile beyin omurilik sıvısı, plevral ve perikardial aspiratlar gibi normalde steril olan vücut sıvıları diğer örnekleri oluşturmaktadır(63).

Normal flora içeren klinik örneklerle ve alınmaları ya da transport işlemleri sırasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünülen klinik örneklerle; organik kalıntılardan arındırmak, bakteri ve mantarları elimine etmek amacıyla dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi uygulanır. Günümüze kadar çok sayıda homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi tanımlanmıştır. Bunlar ;

- N-asetil-L-sistein (NALC)-Sodyum hidroksit (NaOH) yöntemi,
- %4'lük NaOH yöntemi,
- Zefiran-trisodyum-fosfat yöntemi,
- Oksalik asit yöntemi,
- Setilpridinyum klorid-sodyum klorid yöntemi,
- Sülfirik asit yöntemidir.

Günümüzde rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında en yaygın kullanılan yöntem NALC ve NaOH yöntemidir. Bu yöntemde; NALC mukolitik, NaOH dekontaminant ve sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin hacmine eşit miktarda NALC-NaOH eklenip vorteks ile iyice karışması sağlandıktan sonra 15 dakika beklenmektedir. Bu süre sonunda fosfat tamponu ile nötralizasyon sağlanmaktadır. Konsantre etmek amacıyla uygulanan santrifüj sonrası elde edilen çökeltiliden preparatlar hazırlanmakta ve uygun besiyerlerine ekimleri yapılmaktadır(29). Kistik fibrozis ya da bronşektazili hastaların,

özellikle *Pseudomonas aeruginosa* gibi aerop gram negatif basillerle kolonize olmuş örneklerinde NALC-NaOH ve %5'lik oksalik asit yöntemi beraber kullanılmaktadır. Özellikle hızlı üreyen mikobakteriler olmak üzere tüm TDM'ler dekontaminasyon prosedürlerine MTBK'den daha duyarlıdır. Bu yüzden kullanılan yöntem bu mikobakterileri ortadan kaldıracak kadar ağır olmamalıdır. Ayrıca TDM şüpheli örnekler oksalik asit dekontaminasyon yöntemi uygulanması, TDM'lerin kültürde üretilme şansını azaltmaktadır(48).

4.9.2. Mikroskopik Değerlendirme

En ucuz, kolay ve en sık kullanılan yöntemdir. Yaymada ARB saptanması, klinik örnekte mikobakteri varlığını gösteren ilk bakteriyolojik kanıttır. Mikroskopik incelemede, aside dirençli bakteri görülmesi için örneğin mililitresinde 5.000-10.000 basil bulunması gereklidir. Günümüzde halen balgam ve diğer klinik örneklerden yayma ile ARB aranması ve bunun kültür ile doğrulanması tüberküloz tanısında altın standarttır. Mikobakteriler için başlıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir(64).

- Karbolfuksin boyama :
 - o Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN)
 - o Kinyoun
- Florokrom boyama :
 - o Auramine O
 - o Auramine-Rhodamine

Bu iki boyama yöntemi ile hazırlanan yaymaların raporlanmasında farklı değerlendirme kriterleri kullanılmaktadır. Boyalı preparatların değerlendirilmesinde ve sonuçlarının raporlanmasında yaygın olarak, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 4)(65).

Mikroskopik incelemenin duyarlılığı %22-80 arasında değişkenlik göstermektedir. Duyarlılığı etkileyen faktörler arasında; incelenen örneğin türü, santrifüjleme hızı, boyama tekniği, değerlendiren kişinin deneyimi, kullanılan kültür yöntemi ve değerlendirilen hasta popülasyonu sayılabilir. Mikobakterilerin aranmasında mikroskopik incelemenin özgülüğü ise çok yüksektir(66).

Tablo 4. Karbolfuksin ve florokrom yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi

	Aside Dirençli Basil Sayısı / Mikroskop alanı		
Sonuç	Karbol-Fuksin Boyama (1000x)	Florokrom Boyama (250x)	Florokrom Boyama (450x)
Aside Dirençli Bakteri Görülmedi	Negatif	Negatif	Negatif
Şüpheli (Yeni örnek ile tekrar edilmeli)	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/ 70 alan
1+	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
2+	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
3+	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/ 1 alan
4+	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/ 1 alan

4.9.3. Kültür Yöntemleri

Tüberküloz ve TDM enfeksiyonlarının kesin tanısı basilin kültürde üretilmesi ile konulur. Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen mikobakterilerin tanısında halen altın standart olmaya devam etmektedir. Kültür işlemi sayesinde; tür düzeyinde tanımlama işlemleri için gerekli izolatlar elde edilebilir, bakterilerin canlılıkları doğrudan gösterilebilir ve ilaç duyarlılık testleri yapılarak hastalar doğru tedavi edilebilir. Çoğaltılan izolatlar daha sonraki araştırmalar için saklanarak yeni epidemiyolojik verilerin elde edilebilir olması da çok önemlidir. Aside dirençli basillerin kültürde üretilmesi için örneğin her mililitresinde 10-100 canlı basil olması yeterlidir(67). Mikobakterilerin üremeleri için özel besiyerlerine gereksinimleri vardır. Bu besiyerleri kompleks yapıda olup, katı ve sıvı besiyerleri olarak sınıflandırılırlar.

- Katı Besiyerleri :
 - o Yumurta Bazlı
 - § Löwenstein-Jensen(LJ)
 - § Petragnani
 - § American Thorasic Society
 - § Trudeau
 - o Agar Bazlı

§ Middlebrook 7H10

§ Middlebrook 7H11

- Sıvı Besiyerleri
 - o Middlebrook 7H9
 - o Dubos Tween albümin

Mikobakterilerin birincil izolasyonunda, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) klasik katı besiyerleri yanında bir sıvı besiyerinin birlikte kullanılmasını önermektedir(68).

Katı besiyerlerine çeşitli antimikrobiyal maddelerin eklenmesiyle kontaminant mikroorganizmaların üremeleri baskılanır. Bu amaçla hazırlanan seçici besiyerleri mevcuttur. Bunlar arasında; sikloheksimid, nalidiksik asit ve linkomisin içeren mycobactosel LJ besiyeri, penisilin ve nalidiksik asit içeren LJ Gruft besiyeri, karbenisilin, polimiksin B, trimetoprim laktat ve amfoterisin B içeren Mitchison'un seçici 7H11 (7H11S) besiyeri sayılabilir(69).

Günümüzde özellikle ilk izolasyonda yumurta bazlı olan LJ besiyeri yaygın olarak kullanılmaktadır. Yumurta bazlı besiyerlerinin; iyi bir tampon kapasitesine sahip olmaları, buzdolabında birkaç ay gibi uzun raf ömürlerine sahip olmaları ve çoğu mikobakterinin iyi üremesini desteklemeleri önemli avantajlarıdır. Bunun yanında koloni oluşumunun 18-24'üncü günlerden önce saptanamaması ve duyarlılık testleri için ilaç konsantrasyon ayarının yapılamaması dezavantajlarıdır.

Yumurta bazlı besiyerlerinin opak görünümlü olmasına karşın, agar bazlı besiyerleri şeffaftır. CLSI duyarlılık testleri için agar bazlı besiyerlerini önermektedir. Ancak pahalı ve raf ömürlerinin nispeten kısa olması (buzdolabında bir ay kadar) önemli dezavantajlarıdır(69).

Sıvı besiyerleri; mikobakterilerin primer izolasyonu, stok suşların pasajlarının yapılması, ilaç duyarlılık testleri ve diğer in vitro testler için inokulum hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle Middlebrook 7H9, bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakteriyi çoğaltmak ve dolayısıyla izolasyon şansını artırmak amacıyla kullanılmaktadır(70).

Bazı türler kültür ortamında üreyebilmek için özel ek maddelere ihtiyaç duymaktadır. Örneğin *M. haemophilum*'un üretilmesi için ferrik amonyum sitrat, hemin veya hemoglobin gibi demir içeren bileşiklerin eklendiği besiyerleri, *M. ulcerans* için yumurta sarılı besiyerleri, *M. genavense* ve *M. avium subsp. paratuberculosis* için de mikobaktin J eklenmiş besiyerleri kullanılmalıdır(48).

Klasik kültür yöntemleri dışında hızlı sonuç veren kültür yöntemleri de mikobakterilerin tanısında kullanılan rutin yöntemler arasında yer almaktadır. Bu yöntemlerde zengin içerikli besiyerleri kullanılarak hem mikobakterilerin izolasyon şansı arttırılmakta hem de mikobakterilerin üremesi erken dönemde sağlanmaktadır. Bu sistemler arasında, bifazik sistem Septi-check AFB sistemi, kolorimetrik sistem BacT/ALERT sistemi, karbondioksit oluşumunu saptayan sistem ESP MYCO sistemi, floresans ile değerlendirilen sistem Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT), TK kültür sistemi ve manuel sistemler MB-Redoks sayılabilir(69).

TDM kültürleri için en uygun sıcaklık 28°C ile 37°C arasındır. Klinik yönden önemli olan yavaş üreyen mikobakteri türleri genellikle 35°C - 37°C arasını tercih ederken, istisna olarak *M. haemophilum* 28°C - 30°C, *M. ulcerans* 25°C - 33°C, *M. chelonae* 28°C - 33°C arasında iyi üremektedir. Hızlı üreyen mikobakteriler ve *M. marinum* ise 28°C - 30°C dereceleri arasında iyi üremektedir. Tüberküloz dışı mikobakterilerin çoğu 2-3 hafta içinde kültürde üremektedir. Hızlı üreyen mikobakteriler genellikle 7 gün içinde ürerken, *M. genavense* ve *M. ulcerans*'ın üremesi için 8 - 12 hafta gerekmektedir. TDM'lerin üreme zamanları tanımlamada önemli olduğu için mutlaka kaydedilmelidir(48).

4.9.3.1. BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Biosciences)

Uzun yıllar boyunca rutin laboratuvarlarda izolasyon, tanımlama ve duyarlılık testlerinin uygulandığı yarı otomatize radyometrik bir sistemdir. Bu sistemde kullanılan BACTEC 12B besiyeri, ¹⁴C işaretli palmitik asit içerir. Mikobakterilerin ¹⁴C işaretli palmitik asit kullanımı sonucu ¹⁴CO₂ oluşur ve sistem belli aralıklarla ¹⁴CO₂ miktarını ölçerek mikobakterilerin varlığını bir üreme indeksi olarak gösterir. Ekim işleminden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı, kontaminant mikroorganizmaların üremesini engellemek için ilave edilmelidir. BACTEC 12B besiyerinin radyoaktif madde içermesi, çapraz kontaminasyon, enjektörlerin yaygın kullanımı sonucu oluşan laboratuvar kazaları sistemin dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bu nedenlerle üretimi ve rutin laboratuvarlardaki kullanımı son bulmuştur.

4.9.3.2. MGIT 960 (Becton Dickinson, Biosciences)

Rutin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan tam otomatize ve radyometrik olmayan bir sistemdir. MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon

bulunmaktadır. Floresan madde, sıvı besiyerindeki oksijen varlığında maskelenmektedir. Üreyen mikobakteriler tarafından oksijenin tüketilmesi sonucu açığa çıkan floresans, mikobakterilerin varlığını gösterir. MGIT 960'ın duyarlılığı, eskiden kullanılan BACTEC 460 TB'ye benzer olmakla birlikte kontaminasyon oranları daha yüksektir. MGIT 960'ın, BACTEC 460 TB'den en önemli avantajları ; çapraz kontaminasyon olasılığının düşük olması, enjektör ile inokulasyona ihtiyaç duyulmaması, radyoizotop içermemesi ve mikobakteri izolasyon süresinin yaklaşık 2-3 gün daha kısa olmasıdır(71). BACTEC 460 TB'ye kıyasla yüksek kontaminasyon oranları ve kan ile floresanın maskelenmesi, MGIT 960'ın dezavantajlarıdır(69,72).

4.10. TDM Türlerinin Tanımlanması

TDM enfeksiyonlarına özgül klinik bulgular olmadığı için, kesin tanı mikrobiyolojik inceleme ile konulmaktadır. Bu mikroorganizmalar tanımlanırken hem fenotipik, hem de genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır. Mikobakterilerin tanımlanmasında 1980'li yıllara kadar fenotipik özellikli testler yaygın olarak kullanırken, günümüze kadar olan süreçte moleküler yöntemlerdeki ilerlemenin etkisi ile genotipik tanımlama testleri yoğunluk kazanmıştır(4).

4.10.1. Fenotipik Testler

Tüberküloz dışı mikobakteriler; öncelikle üreme süreleri, üreme ısıları, koloni görünimleri ve pigment oluşturma özelliklerine göre gruplandırılır. Bu gruplama sonunda tanımlanacak olan mikobakteriler için çok sayıda biyokimyasal test uygulanmaktadır. Bunlar arasında; arilsülfataz, katalaz, niasin akümülyasyon testi, pirazinamidaz ve üreaz üretimi, sodyum klorür toleransı, tiofen-2 karboksilik asit hidrazid ile üremenin inhibe edilmesi, nitrat ve tellürit redüksiyonu, tween 80 hidrolizi sayılabilir.

Tablo 5. Önemli TDM türlerinin biyokimyasal özellikleri

TDM TÜRLERİ	OIS	PG		N T	NR	T80 H	KATALAZ		AS	U	PRZ	DU	GELİŞİM		
	°C	Işık	Karanlık				SQ	68°C					T ₂ H	%5 NaCl 28°C	Mac CA
MAK	37	Açık sarı	Açık sarı	-	-	-	<45	-	-	-	+	-	+	-	V
<i>M. kansasii</i>	37	Sarı	Açık sarı	-	+	+	>45	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>M. marinum</i>	30	Sarı	Açık sarı	V	-	+	>45	-	V	+	+	-	+	-	-
<i>M. simiae</i>	37	Sarı	Açık sarı	+	-	+/-	>45	+	-	+	-	-	+	-	
<i>M. celatum</i>	37	Sarı	Açık sarı	-	-	-	<45	+	+	-	+	-	+	-	-

<i>M. szulgai</i>	37	Sarı portakal	Açık sarı	-	+	V	>45	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>M.scrofulaceum</i>	37	Sarı	Sarı	-	-	-	>45	+	-	+	V	-	+	-	-
<i>M. gordonae</i>	37	Sarı portakal	Sarı	-	-	+	>45	+	-	-	V	-	+	-	-
<i>M.flavescens</i>	37	Sarı	Sarı	-	+	+	>45	+	-	+	+	-	+	V	-
<i>M.xenopi</i>	42	Sarı	Sarı	-	-	-	<45	+	+		+	-	+	-	-
<i>M.terrae</i>	37	Sarı	Açık sarı	-	V	+	>45	+	+	-	V	-	+	-	V
<i>M.fortuitum</i>	37	Sarı	Sarı	-	+	V	>45	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M.chelonae</i>	28	Açık sarı	Açık sarı	V	-	V	>45	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>M.,abscessus</i>	35	Açık sarı	Açık sarı	-	-	V	>45	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M.smegmatis</i>	37	Sarı	Sarı	-	+	+	>45	+	-			+	+	-	
<i>M. lentiflavum</i>	37	Sarı	Sarı	--	-	-	>45	V	-	-	V		-	-	-
<i>M. peregrinum</i>	37	Açık sarı	Açık sarı	-	+	V	>45	V	+	+	V	+	V	+	-
<i>M. pulveris</i>	28	Açık sarı	Açık sarı	-	+	+	>45	V	V	V	+	V	V	+	V
<i>M. alvei</i>	30	Açık sarı	Açık sarı	-	-	+	V	+		+	-	-	V	-	-
OISve OGZ: Optimum izolasyon zamanı ve optimum gelişme zamanı, PG: Pigment gelişimi, NT:Niasin testi, NR: Nitrat redüksiyonu, T80H: Tween 80 hidrolizi, SQ: Semikantitatif katalaz, AS: Aril sülfataz, U: Üreaz, PRZ:Pirazinamidaz, DU: Demir uptake, Mac CA: Mac Conkey															

Biyokimyasal testler ile az sayıda mikobakteri türünün birbirlerinden ayırt edilmesi sağlanabilmektedir. Uygulamada görülen başlıca sorunlar ;

- Klasik tanımlamada çok sayıda test uygulanmasına gereksinim duyulması,
- Ancak bol miktarda üremiş mikobakteri kültürleri üzerinden tanımlamanın yapılabilmesi,
- Kontaminasyon riskinin daha yüksek olması,
- Oldukça fazla ayıraç gerektirmesi,
- Elde edilen verilerin pek çok mikobakteri türünde ortak olması veya aynı türlerin farklı sonuç verebilmesi gibi zorlukların olması,
- Test sonuçlarının standart suşlarla karşılaştırma gerekliliğinin olması,
- Sonuca ulaşmak için uzun zamana gereksinim duyulması,
- Mikobakterilerin ortama göre fenotipik farklılaşma göstermeleri,
- Geniş laboratuvar kapasitesi ve tecrübeli personel gerektirmeleridir.

Tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan bu biyokimyasal testler sadece belli türleri birbirinden ayırt edebilmektedir. Mikobakterilerin üreme özelliklerinin belirlenmesi ve geleneksel biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması yaklaşık 3-6 hafta, hatta bazen daha uzun sürebilmektedir. Biyokimyasal testler zahmetli ve uzun zaman gerektirdiği için günümüzde neredeyse hiç kullanılmamaktadır(4,64).

4.10.2. Moleküler Testler

Klasik tanı yöntemleri olan mikroskopi ve kültür, mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında günümüzde halen altın standart olarak kabul edilmesine rağmen, tanı süresinin uzun olması ve yeni etkenlerin tanımlanmasında yetersiz kalmaları nedeniyle moleküler yöntemlerin önemi artmıştır. Mikroorganizmanın genomunda çok iyi korunmuş sadece o mikroorganizmaya özgü dizilerin hedef alınması ile tür tayinin yapılması, moleküler yöntemlerin ana prensibini oluşturmaktadır. Bu sayede tek bir nükleotidin delesyonu veya yer değiştirmesiyle oluşmuş farklı türler bile ayırt edilebilmektedir. TDM'lerin laboratuvar tanısında kullanılan moleküler yöntemler arasında ; Nükleik asit hibridizasyon yöntemleri, Polimeraz zincir tepkimesi (PZT)-restriksiyon enzim analizi yöntemi (PRA), “*Single-stranded conformation polymorphism analysis*” (SSCP) yöntemi, “*DNA microarray*” yöntemi, kromatografik mikolik asit analiz yöntemleri ve DNA dizi analizi bulunmaktadır.

4.10.2.1. Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri

DNA prob teknolojileri : Bazı TDM türlerinin tanımlamasında 16S rRNA'yı hedef alan akridiyum ester işaretli DNA problemler yaygın olarak kullanılmaktadır. AccuProbe (GenProbe Inc, San Diego, CA) ticari kitleri ile, MTBK, MAK, *M. kansasii* ve *M. gordonae* hızlı şekilde tanımlanmaktadır. Kolay uygulanan bir yöntem olmasına rağmen, DNA problemlerinin dezavantajları; MTBK ile *Mycobacterium celatum* tip 1 ve 3 arasında çapraz reaksiyon görülebilmesi, sonikatör ve luminometre gibi cihazlara ihtiyaç duyulmasıdır(73).

Line prob teknolojileri : Son zamanlarda TDM'lerin tanımlanmasında “*internal transcribed spacer*” (ITS) gen bölgesini hedef alan INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics N.V.,Zwijndrecht, Belgium) ve 23S rRNA genini hedef alan GenoType Mycobacteria CM/AS (CM, common mycobacteria; AS, additional species), (Hain Lifescience GmbH, Nehren Germany) ters hibridizasyon testleri rutin olarak kullanılmaktadır. INNO-LiPA Mycobacteria v2 ile tek basamakta 16 farklı mikobakteri türü (*M. tuberculosis* kompleks, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae grup*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. fortuitum-peregrinum* kompleks, *M. smegmatis*) tanımlanabilmektedir. GenoType Mycobacteria yönteminde ise tanımlanması istenen mikobakteri izolatu önce daha sık görülen mikobakteri türlerinin saptandığı GenoType Mycobacteria CM testiyle değerlendirilir, bu testle tanımlanamayan mikobakteriler ise genellikle daha az görülen mikobakteri türlerini saptayan GenoType Mycobacteria AS testi ile tanımlanmaktadır.

GenoType Mycobacteria CM testi ile ; *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*-*M. ulcerans*, *M. peregrinum*, *M. xenopi* ve *M. tuberculosis* kompleks tanımlanabilmektedir. Ancak izolat GenoType Mycobacteria CM testi ile tanımlanamazsa, GenoType Mycobacteria AS testi ile tanımlama yapılır. Bu test daha nadir izole edilen ; *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, ve *M. shimoidei*'yi tanımlayabilmektedir(74). Bu testler hızlı uygulanmakta ve kolay bir şekilde yorumlanmaktadır(75,76).

4.10.2.2. PZT-Restriksiyon Enzim Analizi Yöntemi (PRA)

Mikobakterilerin hızlı bir şekilde tanımlanması için “PCR-REA” (Restriksiyon enzim analizi) (PRA) ve diğer ismi “PCR–restriction fragment length polymorphism” (PCR-RFLP) olan yöntem geliştirilmiştir. Bu teknik; tüm mikobakterilerde bulunan hsp65 gen bölgelerini hedef alan PZT, daha sonra ampliconların restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elde edilen ürünlerin elektroforezi aşamalarından oluşmaktadır. Hibridizasyon basamakları ve radyoaktivite içermeyen bu yöntem ile elde edilen paternler tür saptama cetveline göre analiz edilerek, kısa sürede sonuç vermektedir(77).

Restriksiyon endonükleaz enzimleri (RE); kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen enzimlerdir. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin büyük bir kısmı bakteriler, bir kısmı virüsler ve ökaryotik canlılar tarafından sentezlenmektedir. Bu enzimler metilaz aktivitelere, alt ünite yapılarına, kesim özgüllüklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre, tip I, II, III ve “homing” endonükleazlar olarak 4 genel grupta sınıflandırılmaktadır. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin özelliklerinden en dikkate değer olanı, bu enzimlerin optimal şartlarda özgül DNA'yı en yakın dizilimden kesebilme başarılarının optimal olmayan şartlarda oldukça değişmesidir. Örneğin; *EcoRI* enziminin tanıma bölgesi (5'-GAATTC-3')'ne bağlanma oranı en yakın tanıma bölgesi (5'-TAATTC-3')'ne kıyasla 10^5 kat daha fazladır. Ancak, enzim için optimal olmayan şartlar altında bu oran oldukça değişmektedir. Enzimlerin benzer bölgeleri kesme işlemine, bir enzimin “star aktivitesi” denilmektedir. Kullanılan enzimlerin star aktiviteye sahip olup olmadıklarının bilinmesi moleküler çalışmaların başarısı açısından önemlidir(78).

4.10.2.3. “Single-stranded conformation polymorphism” (SSCP) Yöntemi

Mikobakterilerin tanımlanmasında dizi analizine alternatif olan bir yöntemdir. Bu yöntemde hedef genin PZT ile çoğaltılmış kısa dizileri kullanılır. Bu diziler ısı ile denatüre edilerek, tek zincirler elde edilir. Tek zincirlerin renatürasyonu sonrasında, farklı dizilerdeki parçalar farklı tersiyer konformasyonlar oluştururlar. Bu parçalar elektroforez ile ayrıştırıldığında, her parça farklı bir hızla hareket eder. Bu yöntem temel olarak genomik DNA’daki nokta mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılır. Bunun yanı sıra son yıllarda, 16S rRNA geninin PZT ile çoğaltılmış parçalarının SSCP analizi, bakteri türlerinin tanımlanmasında da kullanılmaktadır.

Mikobakteri türlerinin tanımlanmasına yönelik olarak geliştirilmiş olan SSCP yönteminde, mikobakteriyel 16S rRNA geninin değişken bölgelerine özgül dört ayrı çift iplikçikli parça, dört çift floresan işaretli primer ile çoğaltılmakta ve elde edilen ürünlerin SSCP analizi yapılmaktadır. Bu yöntemle PZT sonrasında SSCP analizi sonucu 30 dakika içinde alınabilmekte, kapiller elektroforez sistemi sayesinde aynı anda 16 örnek test edilebilmektedir. Hızlı ve özgül bir yöntemdir(4).

4.10.2.4. “DNA microarray”

“DNA microarray” çok sayıdaki DNA dizilerinin hızlı bir şekilde incelenmesini sağlayan yöntemdir. PZT ile elde edilen ampikonların, çok sayıda farklı oligonukleotid prob içeren minyatür analitik araçlar olan “DNA chip” üzerinde kendine uyan prob ile hibridize olması sonrasında ortama yayılan floresan sinyallerin bir tarayıcı tarafından saptanması esasına göre mikobakterileri tür düzeyinde tanımlamaktadır. Aynı zamanda *M. tuberculosis*’in rifampisin direncine yol açan *rpo* β gen mutasyonlarının belirlenmesinde de kullanılabilir. Testin ortalama sonuçlanma süresi 4 saattir. Bu yöntemin olumsuz tarafları, pahalı olması ve sınırlı sayıda türü tanımlayabilmesidir(79).

4.10.2.5. Mikolik Asit Analizi

Mikolik asitler mikobakteri hücre duvarının önemli bir kısmını oluşturan uzun zincirli β -hidroksi yağ asitleridir. Her mikobakteri türünde farklı fonksiyonel gruplar ve farklı karbon sayılı mikolik asitler bulunur. Türe özgü bu farklılıklar nedeniyle mikolik asit analizi mikobakteri türlerinin tanımlanmasında önemlidir. Bu amaçla “thin-layer chromatography” (TLC), “high-performance liquid chromatography” (HPLC) ve “gas-liquid chromatography” (GLC) teknikleri kullanılmaktadır. TLC yöntemi uygulanarak mikolik asitler taşıdıkları ester gruplarına göre yedi grup altında toplanmaktadır. Bundan sonraki

aşamada, mikobakteri hücresinden saflaştırılan mikolik asitler silikon jel üzerinde yürütülmekte ve oluşan paternler standart suşlarla karşılaştırılarak tanımlama yapılmaktadır. HPLC analizinde, mikolik asitler polarite ve karbon sayılarına göre ayrılmaktadır. Daha polar olan ve kısa karbon zincirli mikolik asitler, daha kısa elüsyon zamanlarına sahip olmaktadır. Bu aşamadan sonra elde edilen kromatogram grafikleri standart suşların grafikleriyle karşılaştırılarak tanımlama yapılır. GLC yönteminde ise sadece mikolik asitler değil, mikobakteri hücre duvarının bütün yağ içeriği analiz edilir. Bu üç mikolik asit analiz yöntemi içinde en güvenilir sonuçlar HPLC yöntemi ile elde edilir. TLC ve GLC yöntemleriyle bazı mikobakteri türleri aynı grafik paternlerini verdiği için, her türün tanımlanması mümkün olmamaktadır(4). Özellikle hızlı üreyen mikobakterilerin mikolik asit paternlerinin çok benzer olması ve benzer şekilde *M. avium*-*M. intracellulare* ayrımındaki güçlükler, mikolik asit analiz yöntemlerinin dezavantajlarıdır(80). Mikolik asit analizi; pahalı ekipman ve yüksek maliyet gerektirmesi nedeniyle yalnızca referans laboratuvarları tarafından kullanılması önerilmektedir(4,57).

4.10.2.6. DNA Dizi Analizi

Mikobakteri türlerinin tanımlamasında DNA dizi analizi altın standarttır ve aynı zamanda suşların ilişkileri hakkında filogenetik bilgi sağlamaktadır. Birkaç basamakta yapılmaktadır. Bunlar sırasıyla; nükleik asit izolasyonu, amplifikasyonu, nükleik asit hedefinin işaretlenmesi, işaretlenmiş hedeflerin elektroforetik olarak ayrılması ve elektroforezden elde edilen bilginin anlamlı DNA dizi bilgisine dönüştürülmesidir. Yöntem Sanger'in zincir sonlandırma tekniği temeline dayanmaktadır. Bu yöntem DNA polimerazların dNTP'ler yanında, deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de substrat olarak kullanmaları esasına dayanır. Sentezlenen DNA iplikçiğine dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP eklenmesi halinde zincir uzaması durmaktadır. Mikobakterilerin tanımlanması amacıyla dizi analizi için hedef olarak seçilen en önemli gen bölgeleri, 16S rRNA, *hsp* 65, ITS, *gyrB*, *recA* ve *rpoB* 'dir. Bu gen bölgeleri tüm mikobakterilerde bulunan, mutasyondan çok iyi korunan ve her türe özgü değişken diziler içeren gen bölgeleridir.

Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmalarında en önemli ve en sık kullanılan iki bölge 16S rRNA ve *hsp*65 gen bölgeleridir. Bu bölgelerin dizi analiziyle ayrılamayan türler için diğer bölgeler alternatif olarak kullanılması önerilmektedir(4). 16S rRNA geni, bütün bakterilerde çok iyi şekilde korunmuş olması ve türe özgü değişken diziler içermesi nedeniyle

bakterilerin moleküler tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilen bir hedef bölgedir. 16S rRNA dizi analizi, çoğu mikobakteri türünün tanımlanmasını sağlamasına rağmen, *M. tuberculosis* kompleks üyelerini ayırt edemez. Benzer olarak önemli bir patojen olan *M. kansasii* ile patojenik olmayan *M. gastri*, *M. marinum* ile *M. ulcerans*'ın ve *M. malmoeense* ile *M. szulgai*'nin dizi analizi aynıdır. Bunların ayırt edilmesi için ek bölgelerin dizi analizi gerekmektedir(11,75).

Dizi analizi yöntemlerinde, elde edilen bakteri dizilerini bilgisayar ortamında karşılaştırmak için standart dizilere ihtiyaç vardır. Değişik kaynaklardan elde edilmiş standart dizilerde de zaman zaman farklılıklar ortaya çıkabilmekte ve yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Bir standardizasyon sağlamak ve dizi analizi sonuçlarının güvenilirliğini arttırmak amacıyla kurulmuş standart dizi analizi servisleri mevcuttur. “*Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms*” (RIDOM), “*European Molecular Biology Laboratory*” (EMBL), “*Ribosomal Database Project Laboratory*” (RDPL-II) ve “*DNA Databank of Japan*” (DDBJ) gibi çeşitli veri tabanları, internet aracılığıyla kullanıma sunulmuştur.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Çalışmaya Alınan TDM Suşları

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına, 2004-2010 yılları arasında gönderilen solunum yolları örneklerinden soyutlanan 156 adet TDM izolatu çalışmaya alındı. Hastaların ardışık örneklerinden izole edilen aynı etkenler çalışma dışı bırakılmıştır.

5.2. TDM'lerin Üretilmesi

2004-2009 yılları arasında, Mikobakteriyoloji Laboratuvarında TDM olarak tanımlanmış örneklerle ait BACTEC 12B şişelerinden 0,5 mL alınıp, LJ besiyerine ekim yapıldı. 2010 yılına ait izolatlara, rutinde üreyen LJ besiyerlerinden alınan kolonilerin 0,5 mL steril distile su içerisinde süspanse edilerek yeni LJ besiyerlerine ekilmesi ile üretildi. Bütün işlemler biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. Ekim yapılan LJ besiyerleri 35°C'de inkübe edildi ve üremeler kontrol edilerek, üreme zamanları not edildi.

5.3. TDM'lerin DNA İzolasyonu

5.3.1. İzolasyonda Kullanılan Gereç ve Kimyasallar

- Steril, “RNAase-DNAase free” vidalı kapaklı mikrosantrifüj tüpleri
- Steril olarak hazırlanmış, serum fizyolojik, distile su ve eküvyon
- Mikro santrifüj cihazı (Mikro 120, Hettich Zentrifugen-Almanya)
- Vorteks cihazı (MS2 Minishaker, IKA Works Inc.-ABD)
- Tris-EDTA tamponu (10xTris-EDTA, Fisher Bioreagents-ABD)
- Isı bloğu cihazı (Major-Science, Cool-Hotter dry bath incubator-Tayvan)
- 100-1000 µL steril pipet uçları ve pipetör

Örneklerin tüpler arasındaki transfer işlemleri biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. DNA izolasyon basamağında kullanılan Tris-EDTA tamponu 1x olması gerektiğinden stok solüsyon steril distile su ile 1/10 oranında dilüe edildi. Dilüsyon işlemi sonucu oluşan 1x Tris-EDTA tamponunun içeriği; pH:7,4, Tris:10 mM, EDTA:1 mM şeklindedir.

5.3.2. DNA İzolasyon Basamakları

- Güvenlik kabininde TDM izolatına ait kültürden steril bir eküvyonla koloniler toplanarak, vidalı kapaklı ependorfta bulunan 1 mL serum fizyolojik içerisine alındı.

- 11.000 G'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Çökelti üzerine 250 µL 1X TE tamponu eklenerek vortekslendi.
- 11.000 G'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Çökelti üzerine 250 µL 1X TE tamponu eklenerek, 95 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 11.000 g de 1 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım DNA ekstraktı olarak -20 °C'de saklandı.

5.4. TDM'lerin hsp65 gen bölgelerinin PZT ile çoğaltılması

TDM'lerin hsp65 gen bölgelerinin 441 baz çiftlik parsiyel bölgesi PZT ile çoğaltıldı(77).

5.4.1. PZT'de Kullanılan Gereç ve Kimyasallar

- dH₂O
- 10X buffer (NH₄)₂SO₄ (Thermo-EP0402)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo-EP0402)
- 10 mM dNTP set (Thermo-R0181)
- Taq DNA polimeraz (Thermo-EP0402)
- Primer 1 (Tb 11): 5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3' (Alpha DNA, Kanada)
- Primer 2 (Tb 12): 5' CTTGTCTGAACCGCATACCCT 3' (Alpha DNA, Kanada)
- TDM DNA ekstraktı
- Steril, "RNAaz-DNAaz free" mikro test tüpleri (0,5 mL)
- 10-100-1000 µL steril, "RNAaz-DNAaz free" filtreli pipet uçları ve uygun pipetörler
- *Thermal cycler* aleti (Techne TC-412, İngiltere)

5.4.2. PZT Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

PZT karışımı temiz odada ve buz üzerinde hazırlandı. Bir örnek için kullanılan malzemeler sırasıyla; dH₂O 32,5 µL, 10X Buffer 5,0 µL, MgCl₂ (25 mM) 4,0 µL, dNTP 10 mM 1,0 µL, Primer 1 (Tb11) 1,0 µL, Primer 2 (Tb12) 1,0 µL ve Taq DNA polimeraz 0,5 µL olacak şekilde toplam 45 µL karışım hazırlandı. Çalışılacak örnek sayısı kadar hazırlanan karışım 0,5 mL'lik tüplerin her birine 45 µL dağıtıldı. Üzerine 5 µL ekstrakte DNA eklendi. *Thermal cycler* aletine yerleştirildi. *Thermal cycler* aletinde aşağıdaki siklus programı uygulandı.

- 95 °C de 5 dakika ön denatürasyon
 - 94°C de 1 dakika
 - 62°C de 1 dakika
 - 72°C de 1 dakika
- } 40 döngü
- 72 °C de 10 dakika son uzatma
 - Reaksiyon 4°C’de durduruldu.

5.5. PZT Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

PZT ürünleri amplifikasyon ürünü saptama basmağının uygulanacağı zamana kadar 2–8°C’de saklandı. PZT ile çoğaltılan hsp65 geninin 441 baz çiftlik bölgesi agaroz jel elektroforezi ile gösterildi.

5.5.1. Kullanılan Gereç ve Kimyasallar

- Tris-Borik asit-EDTA (TBE 10X) (Zeydanlı-DZTBE10-1)
- Etidyum bromit 1 g (AppliChem-A1151)
- Agaroz 100 g (IBI Scientific-IB70073)
- Jel yükleme tamponu (Fermentas-R0611)
- 100 bp DNA marker (Bioron-304005)

Jel hazırlamak için kullanılan TBE, distile su ile 1/10 dilüe edilerek 1X TBE hazırlanmıştır. Etidyum bromit solüsyonu (EtBr), 10 mg/mL konsantrasyonda olması için 1g EtBr 100 mL distile su ile karıştırıldı. Işıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı, 2–8°C sıcaklıkta saklandı. Jel yükleme tamponu 2–8°C’de saklandı. 100 bp. DNA marker - 20°C’de saklandı.

5.5.2. Yöntem

- Elektroforez tankına uygun olarak %2’lik agaroz jel hazırlamak için 0,8 g agaroz 40 mL 1X TBE içerisinde mikrodalga fırında eritildi.
- Tamamen erimiş agarın üzerine 2,5 µL EtBr eklenerek yavaşça karıştırıldı.
- Önceden hazırlanan ve tarakları yerleştirilen elektroforez tank kalıbına döküldü.
- Katılaşması için 20 dk beklendi.
- İlk kuyucuğa standard belirleyici olarak 100 bp. DNA marker yüklendi. (DNA marker, kullanıma hazır olmadığından 2,5 µL marker, 2,5 µL distile su ve 2 µL jel yükleme tamponu homojen olarak karıştırılarak ilk kuyucuğa yüklenmiştir)

- İkinci kuyucuktan itibaren 2 µL jel yükleme tamponu ile homojen olarak karıştırılan 10 µL PZT ürünleri her suş için ayrı ayrı kuyucuklara yüklendi.
- 45 dk. 120 volt'ta elektroforez yapıldı.
- UV transluminatör üzerinde jel fotoğraflandı.

5.6. DNA Sekans Prosedürü

5.6.1. PZT Ürünlerinin Gönderilmesi ve Hizmet Alımı

PZT ürünlerinin jel görüntüleri DNA marker'a göre hizalanarak değerlendirildi. 441 bp uzunluğuna denk gelen, uygun netlikte ve saf bant görülen PZT ürünlerinin kalan 40 µL kısmı sekans işlemine gönderilmek üzere 2–8°C'de saklandı.

PZT ürünleri, saflaştırma ve çift yönlü sekanslama için hizmet alımının yapıldığı Kore'ye gönderildi (Macrogen Inc, Kore). Sekans işlemi için PZT reaksiyonunda kullanılan Tb11 ve Tb12 primerleri kullanıldı. Sonuçlar yaklaşık bir hafta içerisinde kromatogram dosyaları şeklinde ve *ab1* dosya formatında elektronik posta yoluyla tarafımıza gönderildi.

5.6.2. Gönderilen DNA Dizilerinin Analiz Edilmesi

Gönderilen *ab1* formatındaki dosyalar BioEdit (*Biological sequence alignment editor*-Ibis Biosciences, Kanada) programı ile *fasta* formatına dönüştürülerek kayıt edildi. Bu diziler, Genbank'tan (*National Center for Biotechnology Information-National Library of Medicine*, ABD) indirilen referans mikobakteri hsp65 gen bölgesi dizileri ile karşılaştırılarak BioEdit programı ile hizalandı.

Hizalanmış *fasta* formatındaki DNA dizileri, BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool-National Library of Medicine*, ABD) programı ile analiz edilerek 156 adet izolat tür düzeyinde tanımlandı.

6. BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji birimine 2004-2010 yılları arasında gelen örnek sayıları, üreyen MTBK ve TDM sayıları aşağıda gösterilmektedir (Tablo 6).

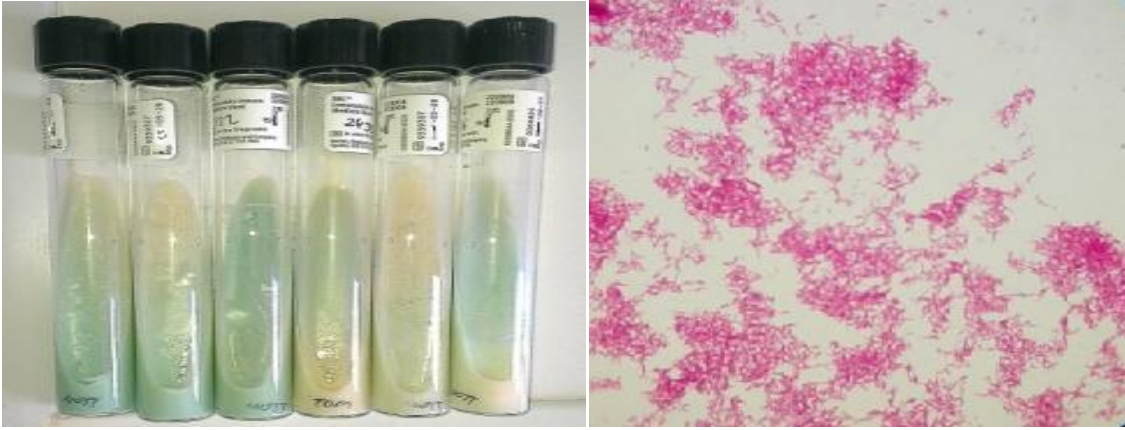
Tablo 6. Yıllara göre gelen, üreyen ve çalışmaya alınan örnek sayıları

Tarih		MTBK Sayısı	TDM Sayısı	Çalışmaya Alınan TDM Sayısı	Laboratuara Gelen Örnek Sayısı
2004	Solunum Yolu Örnekleri	46	31	20	1789
	Solunum yolu dışı Örnekler	19	6	0	
2005	Solunum Yolu Örnekleri	80	10	4	2239
	Solunum yolu dışı Örnekler	16	2	0	
2006	Solunum Yolu Örnekleri	94	15	13	2230
	Solunum yolu dışı Örnekler	17	1	0	
2007	Solunum Yolu Örnekleri	99	38	35	2630
	Solunum yolu dışı Örnekler	23	8	0	
2008	Solunum Yolu Örnekleri	55	50	46	2514
	Solunum yolu dışı Örnekler	11	4	0	
2009	Solunum Yolu Örnekleri	83	15	12	2750
	Solunum yolu dışı Örnekler	37	6	0	
2010	Solunum Yolu Örnekleri	64	26	26	2648
	Solunum yolu dışı Örnekler	29	0	0	

2004-2010 yılları arasında solunum yolu örneklerinden izole edilen TDM sayısı 185 idi. Hastaların mükerrer örneklerinden izole edilen TDM'ler ile pasaj sonrası tekrar üretilmeyen TDM'ler çalışma dışı bırakıldı ve 156 izolat çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan izolatların 86'sı (%55,1) erkek, 70'i (%44,9) kadın hastaya aitti. Örneklerin dağılımı; 78 (%50) bronş lavaj, 65 (%41,7) balgam, 11 (%7) bronkoalveolar lavaj ve 2 (%1,3) trakeal aspirat şeklindeydi.

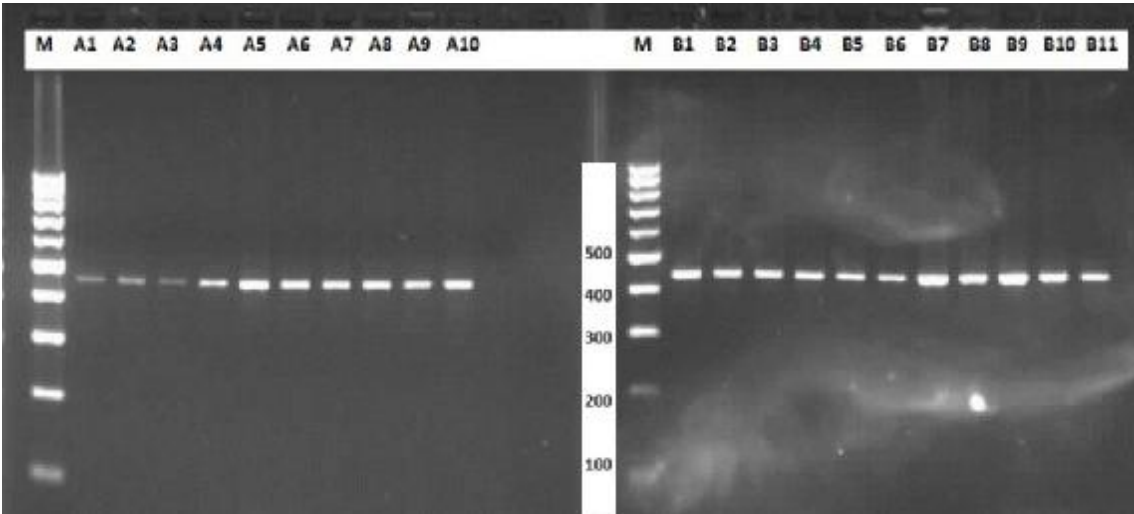
Çalışmaya alınan tüm hasta örneklerinden üremiş TDM izolatları LJ besiyerlerine pasajlandı. Haftada bir kez olmak üzere üremeleri kontrol edilerek, üreme zamanları not edildi. Üreme olan LJ besiyerlerindeki koloniler Kinyoun boyama yapılarak değerlendirildi ve aside dirençli boyanmaları doğrulandı.

Resim 3. LJ besiyerinde üremiş TDM izolatları ve Kinyoun boyama görüntüleri

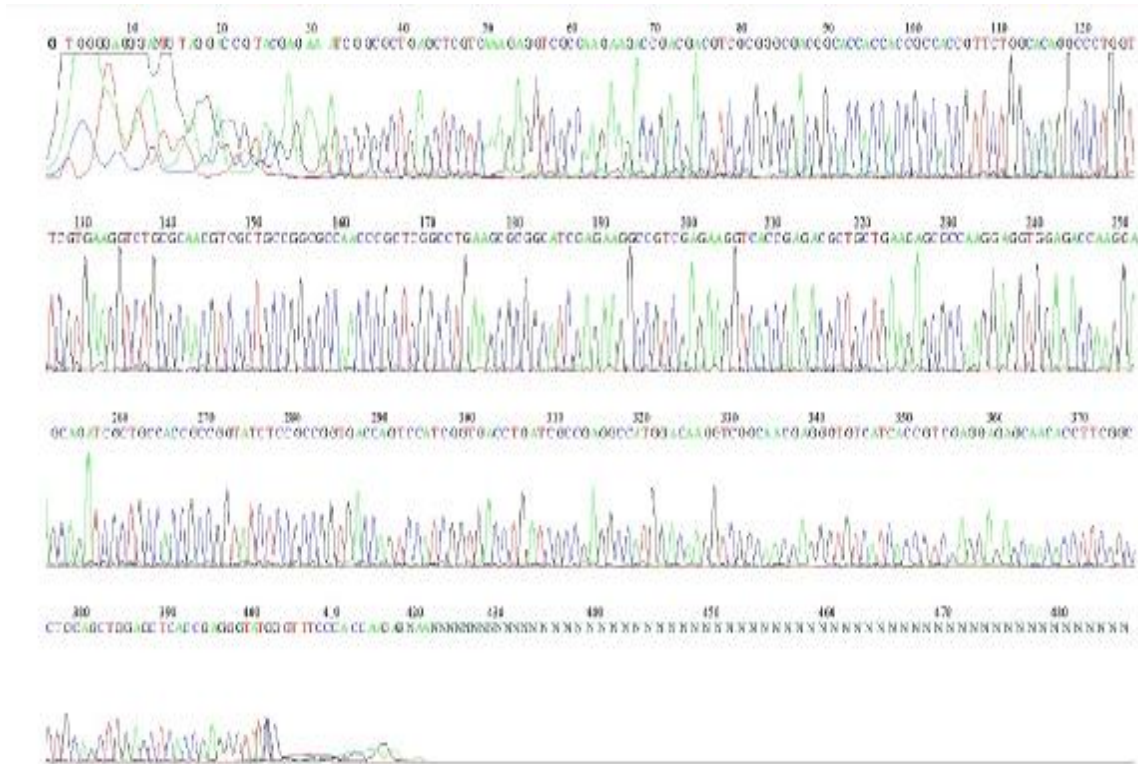


İzole edilen bakterilerin hsp65 geninin 441 bp uzunluğundaki parsiyel bölgesi PZT ile çoğaltıldı ve agaroz jel elektroforezi ile doğrulandı.

Resim 4. PZT ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri



Uygun netlikte ve kalınlıkta olan PZT bantları pürifikasyon ve sekanslama işlemi için Kore'ye (MacroGen Inc. Kore) gönderildi. Yukarıdaki jel görüntülerinden A1, A2 ve A3 numaralı izolatlara ait PZT bantları ince olduğundan tekrar PZT yapıldı. Diğer tüm bantlar sekans işlemine gönderilmek üzere 4 °C'de saklandı. Gelen sonuçlar kromatogram dosyaları şeklindeydi. BioEdit programı ile analiz edilerek BLAST veri tabanı ile tür tanımları yapıldı.



İzolat numarası	Hsp65 sekans sonucu tanımlanan mikroorganizma	Uyumluluk oranı (%)
A-1	<i>Mycobacterium avium</i>	100
A-2	<i>Mycobacterium xenopi</i>	100
A-3	<i>Mycobacterium xenopi</i>	100
A-4	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
A-5	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
A-6	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
A-7	<i>Mycobacterium bolletii</i>	100
A-8	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99

A-9	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
A-10	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
A-11	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	99
A-12	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
A-13	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
A-14	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
A-15	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
A-16	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
A-17	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
A-18	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
A-19	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
A-20	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
A-21	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	99
A-22	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	99
A-23	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	99
A-24	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
A-25	<i>Mycobacterium xenopi</i>	100
A-26	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
A-27	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
A-28	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
A-29	<i>Mycobacterium xenopi</i>	98
A-30	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
A-31	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	99
A-32	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-1	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-2	<i>Mycobacterium xenopi</i>	100
B-3	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-4	<i>Mycobacterium xenopi</i>	100
B-5	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-6	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-7	<i>Mycobacterium xenopi</i>	97
B-8	<i>Mycobacterium xenopi</i>	100
B-9	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-10	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-11	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	99
B-12	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-13	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99

B-14	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-15	<i>Mycobacterium xenopi</i>	100
B-16	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-17	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-18	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-19	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	95
B-20	<i>Mycobacterium abscessus</i>	97
B-21	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-22	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	100
B-23	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-24	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-25	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-26	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-27	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-28	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-29	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-30	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-31	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-32	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-33	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-34	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-35	<i>Mycobacterium simiae</i>	99
B-36	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-37	<i>Mycobacterium simiae</i>	99
B-38	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-39	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-40	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99
B-41	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	99
B-42	<i>Mycobacterium avium</i>	99
B-43	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-44	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	99
B-45	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-46	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-47	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-48	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-49	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-50	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100

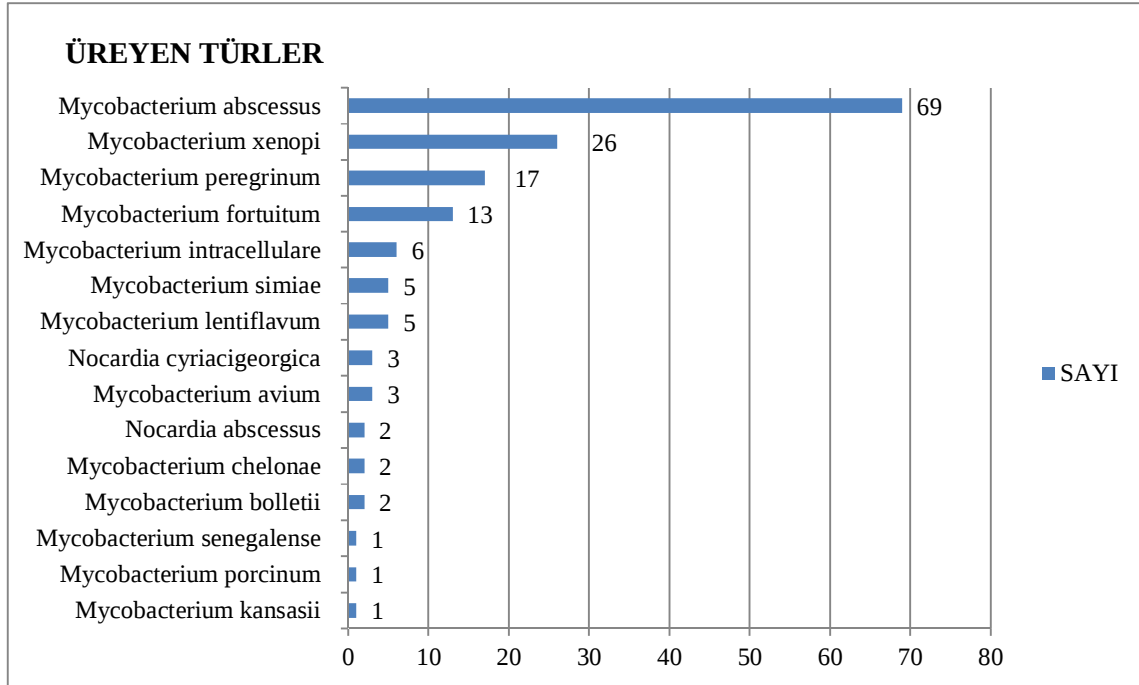
B-51	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	99
B-52	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-53	<i>Mycobacterium xenopi</i>	100
B-54	<i>Mycobacterium simiae</i>	99
B-55	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-56	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-57	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-58	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-59	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	99
B-60	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-61	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-62	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	99
B-63	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
B-64	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	99
B-65	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-66	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-67	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-68	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-69	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-70	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-71	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-72	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-73	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-74	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-75	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
B-76	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
B-77	<i>Mycobacterium senegalense</i>	99
C-1	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	99
C-2	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	99
C-3	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
C-4	<i>Mycobacterium porcinum</i>	99
C-5	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	99
C-6	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	99
C-7	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	99
C-8	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	100
C-9	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
C-10	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	99

C-11	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	99
C-12	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
C-13	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99
C-14	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	99
C-15	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
C-16	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	99
C-17	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99
C-18	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	100
C-19	<i>Mycobacterium bolletii</i>	99
C-20	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
C-21	<i>Mycobacterium abscessus</i>	100
C-22	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	100
C-23	<i>Nocardia abscessus</i>	99
C-24	<i>Mycobacterium chelonae</i>	100
C-25	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	100
C-26	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	100
C-27	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	100
C-28	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	97
C-29	<i>Mycobacterium chelonae</i>	100
C-30	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99
C-31	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	100
C-32	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	100
C-33	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99
C-34	<i>Mycobacterium avium</i>	100
C-35	<i>Mycobacterium abscessus</i>	99
C-36	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99
C-37	<i>Nocardia abscessus</i>	99
C-38	<i>Mycobacterium xenopi</i>	100
C-39	<i>Mycobacterium xenopi</i>	99
C-40	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99
C-41	<i>Mycobacterium simiae</i>	99
C-42	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99
C-43	<i>Mycobacterium simiae</i>	98
C-44	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99
C-45	<i>Mycobacterium kansasii</i>	100
C-46	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99
C-47	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	99

Çalışmaya alınan 156 izolatın tamamı hsp65 gen bölgesi sekans analizi ile tanımlandı. Çalışmada 13 farklı TDM türü ve 2 farklı *Nocardia* türü olmak üzere, toplam 15 farklı tür saptandı. En fazla izole edilen TDM türü 69 (%44,2) adet ile *Mycobacterium abscessus* oldu. Bunu sırasıyla 26 (%16,7) izolat ile *Mycobacterium xenopi*, 17 (%10,9) izolat ile *Mycobacterium peregrinum*, 13 (%8,3) izolat ile *Mycobacterium fortuitum* izledi.

Üreme sayılarına göre tüm türler aşağıda gösterildi (Resim 6).

Resim 6. Sekans analizi ile tanımlanan türlerin dağılımı



Rutin laboratuvarımızda TDM olarak tanımlanan 156 izolatın 5 tanesinin *Nocardia* cinsinden olduğu saptandı. Bunlardan 3 (%1,9) tanesi *Nocardia cyriacigeorgica* ve 2 (%1,3) tanesi de *Nocardia abscessus* olarak tanımlandı. Tanımlanan *Nocardia* izolatlarının tamamının balgam örneklerinden izole edildiği görüldü. Örnek türlerine göre izolatların dağılımı aşağıda gösterildi (Tablo 8).

Tablo 8. Örnek tiplerine göre tanımlanan mikroorganizmaların dağılımı

Üreyen Mikroorganizma	Örnek Türleri				
	BL	Balgam	BAL	TS	Toplam n (%)
<i>Mycobacterium abscessus</i>	37	26	5	1	69 (44,2)
<i>Mycobacterium xenopi</i>	11	15	-	-	26 (16,7)
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	12	-	5	-	17 (10,9)
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	5	7	-	1	13 (8,3)
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	2	4	-	-	6 (3,8)
<i>Mycobacterium simiae</i>	4	1	-	-	5 (3,2)
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	4	1	-	-	5 (3,2)
<i>Mycobacterium avium</i>	2	1	-	-	3 (1,9)
<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	-	3	-	-	3 (1,9)
<i>Nocardia abscessus</i>	-	2	-	-	2 (1,3)
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1	-	1	-	2 (1,3)
<i>Mycobacterium bolletii</i>	-	2	-	-	2 (1,3)
<i>Mycobacterium senegalense</i>	-	1	-	-	1 (0,6)
<i>Mycobacterium porcinum</i>	-	1	-	-	1 (0,6)
<i>Mycobacterium kansasii</i>	-	1	-	-	1 (0,6)
Toplam	78	65	11	2	156 (100)

Laboratuvarımıza gelen solunum yolu örneklerinin büyük çoğunluğu bronş lavaj ve balgam örnekleridir. Bununla doğru orantılı olarak üremeler en sık bronş lavaj örneklerinde olmuş, bunu balgam örnekleri takip etmiştir.

Tablo 9. Tanımlanan izolatların yıllara göre dağılımı

Üreyen Mikroorganizma	Yıllar							
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Toplam
<i>M. abscessus</i>	6	3	12	16	26	5	1	69
<i>M. xenopi</i>	1	-	-	8	10	5	2	26
<i>M. peregrinum</i>	-	-	-	-	2	1	14	17
<i>M. fortuitum</i>	6	1	-	3	3	-	-	13
<i>M. intracellulare</i>	1	-	-	5	-	-	-	6
<i>M. simiae</i>	-	-	-	1	2	-	2	5
<i>M. lentiflavum</i>	2	-	-	-	2	-	1	5
<i>M. avium</i>	1	-	-	-	-	1	1	3
<i>N. cyriacigeorgica</i>	3	-	-	-	-	-	-	3
<i>N. abscessus</i>	-	-	-	2	-	-	-	2
<i>M. chelonae</i>	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>M. bolletii</i>	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>M. senegalense</i>	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>M. porcinum</i>	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>M. kansasii</i>	-	-	-	-	-	-	1	1
Toplam	20	4	13	35	46	12	26	156

Yıllara göre tanımlanan izolatların dağılımı yukarıda verilmiştir. Yıllara göre değişkenlik görülse de en sık tanımlanan *M. abscessus* ve *M. xenopi*'nin 2007-2008 yıllarında sıklıkla izole edildiği, 2004-2007 arasında hiç izole edilmeyen *M. peregrinum*'un ise 2010 yılında pik yaptığı net bir biçimde görülmektedir.

7. TARTIŞMA

Uzun yıllar boyunca tüberküloz hastalığının gölgesinde kalan ve önemsenmeyen TDM enfeksiyonları, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastaların yanı sıra, sağlıklı insanlarda ve hastanede uzun süre yatan hastalarda kolonize olmakta ve ciddi seyir gösterebilmektedir. Bu enfeksiyonların son yıllarda artarak önem kazandığı çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur(10,81). Laboratuvar tanı yöntemlerinin özellikle de moleküler yöntemlerin gelişmesi TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanabilmesine olanak sağlamış, zahmetli konvansiyonel yöntemlerin önüne geçmiştir.

Moleküler yöntemlerin gelişmesi aynı zamanda yeni türlerin keşfini kolaylaştırmış ve 1986'da 50 tane oldukları sanılan TDM tür sayısı günümüzde 140'ın üzerine çıkmıştır(81). Ancak bu kadar çok TDM türüne rağmen 25 kadarı sıklıkla enfeksiyon etkeni olarak görülmekte, diğerleri çevresel olarak bulunup nadiren klinik örneklerden izole edilebilmektedir(82).

Tüm mikobakteriyel enfeksiyonların % 0,5-35'i TDM türlerinden kaynaklanmaktadır(28). Bizim laboratuvarımızda 2004-2010 yılları arasında izole edilen solunum yolu ve solunum yolu dışı tüm mikobakteri izolatlarının %23,9'unu TDM'ler oluşturmaktadır. Sadece solunum yoluna ait mikobakteri izolatlarında TDM'lerin payı %26,2 olarak bulunmuştur. ABD'de yapılmış istatistiksel çalışmada izole edilen 3200 mikobakteri türünün 1/3'ü TDM olarak tanımlanmıştır(47). Tüberküloz için endemik olan Kenya'da 2012 yılında yapılan bir çalışmada 361 mikobakteri enfeksiyonunun 15'i (%4,2) TDM olarak bildirilmiştir(83). 2013 yılında Nijerya'da yapılan bir çalışmada ise 444 mikobakteri izolatının 69'u (%15,5) TDM olarak saptanmıştır(84). Az gelişmiş ülkelerde tanımlama olanaklarının kısıtlılığı TDM'lerin daha düşük oranlarda bildirilmesine neden olabilmektedir(84). Gelişmiş ülkelerde ortalama yaşam süresinin uzaması, bağışıklık sistemini baskılayan tedavi ve hastalıkların artması ve enfeksiyonların tanısındaki gelişmeler, TDM enfeksiyonlarının az gelişmiş ülkelere oranla daha yüksek oranda görülmesini açıklayabilir(29,47,84).

TDM'ler çeşitli bölgelerde enfeksiyon oluşturmakla birlikte en sık neden oldukları tablo solunum yolu enfeksiyonlarıdır(48). Yapılan çeşitli çalışmalarda pulmoner TDM enfeksiyonlarının insidansında ciddi artışlar görüldüğü bildirilmektedir(85). Bildirilen raporlarda TDM insidansının dünya çapında 0,7-1,8/100.000 vaka aralığında olduğu görülmektedir(48). Fransa'da solunum yolu enfeksiyonları içinde TDM insidansı 0,73/100.000 vaka olarak bildirilmektedir(49). ABD'de ise solunum yolu enfeksiyonlarında

bildirilen TDM insidansı 1,8/100.000 vakadır. TDM enfeksiyonları, bildirim zorunlu hastalık olmadığından ülkemizde veriler oldukça kısıtlıdır. Konya’da 2011 yılında yapılan bir çalışmada mikobakteriyoloji laboratuvarlarına tüberküloz ön tanısı ile gönderilen 1670 örnekle yapmış oldukları çalışmalarında %3,7 kültür pozitifliği bildirilmiş ve bunların; %3,1’i (53/1670) MTBK, %0,6’sı (10/1670) TDM olarak tanımlanmıştır(86). İzmir’de farklı bir merkezde yapılan çalışmada, 2004-2009 yılları arasında gelen solunum yolu örnekleri içinde TDM kültür pozitifliğini %2,1 olarak bildirilmiştir(55). Laboratuvarımızda 2004-2010 yılları arasında TDM üremesi saptanan hasta örneklerinin yıllara göre dağılımı sırasıyla %2 - %0,5 - %0,7 - %1,7 - %2,1 - %0,8 - %0,9’dur. Yedi yılın ortalaması %1,2 olarak saptanmıştır. Oranlar genel olarak benzer olmakla birlikte laboratuvarlar arası farkların kullanılan kültür ve tanı yöntemlerinin duyarlılığı ile yöresel farklılıklara bağlı olabilir. Özellikle göğüs hastalıkları üzerine hizmet veren merkezlerin (İzmir merkezli diğer çalışmada olduğu gibi) TDM oranlarının bize göre yüksek olması beklediğimiz bir durumdur.

Mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kültür pozitiflik oranlarının bilinmesi önemlidir. Bu oranların beklenenden yüksek bulunması laboratuvar sorumlusunun dikkat etmesi gereken bir durumdur. Özellikle bronkoskopi ünitesinden gelen solunum yolu örneklerinde ardışık pozitiflikler ve aynı etkenin izole edilmesi, endoskopik malzemelerin sterilizasyonunda bir sorun olabileceğini akla getirmelidir(63,87). Aynı şekilde kültür pozitiflik oranlarının normalin üzerine çıktığı dönemlerde laboratuvar içi kontaminasyon olabileceği de göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle TDM’lerin, hızlı ve doğru şekilde tür düzeyinde tanımlanması önem taşımaktadır.

Son on yılda mikobakterilerin tanımlanmasında moleküler yöntemlerin kullanımı giderek artmıştır(88). Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan DNA prob tekniği kullanımı kolay, hızlı sonuç veren MTBK ile TDM ayrımı yapabilen moleküler yöntem olmakla birlikte, her türe spesifik prob kullanılması gerekliliği ve sınırlı sayıda mikobakterileri tanımlayabilmeleri olumsuz yönleridir(79). PCR-RFLP ucuz bir yöntem olmakla birlikte, DNA kesiminden sonra jelde elde edilen bant görüntülerine göre DNA uzunlukları belirlenerek yapılan tanımlamada, bant uzunluklarının gözle değerlendiriliyor olması standardizasyonu zor hale getirmektedir. Bu yöntem birçok tür için kullanışlı olmasına rağmen yeni türlerin taksonomisinde kullanılamamaktadır(38). SSCP, DNA dizi analizine alternatif olarak geliştirilen daha çok mutasyonların tespiti amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem daha az mikobakteri türünü tanımlayabilmektedir(46). Genomik sınıflandırma ve tanımlamalar mikroorganizmanın iyi korunmuş gen bölgesindeki farklılıkların ortaya

konulmasıyla yapılmaktadır. Bu farklılıkları en iyi şekilde gösteren yöntem DNA dizi analizidir. Bu yöntem yeni türlerin tanımlanmasını ve türler arasındaki taksonomik benzerliğin ortaya konulmasını sağlayabilmektedir. Sekans temeline dayalı tanımlama, laboratuvarlarda klasik test sonuçlarıyla paralellik göstermekte olup moleküler yöntemler içinde referans olma özelliğini taşımaktadır(39). Referans yöntem olması sebebiyle biz de çalışmamızda 156 adet izolatu DNA dizi analizi ile tanımladık. Bu yöntemin en önemli dezavantajı rutin laboratuvarlar için sekans analiz cihazının pahalı olması ve sonuçların analizi için tecrübeli personel gereksinimidir(89).

DNA dizi analizi yönteminde kullanılacak hedef gen bölgesinin seçimi önemlidir. DNA dizi analizi için mikobakterilerinin tanımlanmasında 16S rRNA, recA, hsp65, gyrB, 16S-23S rRNA (ITS), dnaJ, rpoB ve sodA gibi gen bölgeleri kullanılmaktadır. Bu bölgeler tüm bakteri türlerinde bulunan, çok iyi korunan ve her türe göre değişen oranda spesifik genler içermektedir. 16S rRNA gen bölgesi diğer gen bölgelerine göre uzun yıllardır prokaryotların tanımlanmasında ve taksonomisinin yapılmasında kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen gen bölgesidir(90). Ancak mikobakterilerin genotipik yapılarının birbirine çok benzer olduğundan sekansla elde edilen dizi analizlerindeki benzerlikler, sonuçların yorumlanmasında zorluklara neden olmaktadır. 16S rRNA dizi analizi, çoğu mikobakteri türünün tanımlanmasını sağlamasına rağmen bazı türlerin ayırımında başarılı değildir. Önemli bir patojen olan *M. kansasii* ile patojenik olmayan *M. gastri*, *M. marinum* ile *M. ulcerans*'ın ve *M. malmoense* ile *M. szulgaii*'nin 16S rRNA dizi analizi aynı şekildedir. Bunların ayırt edilmesi için ek bölgelerin dizi analizi gerekmektedir(11,75). Alternatif gen bölgelerinden biri olan 16S-23S rRNA gen bölgesi bazı mikobakter için daha fazla spesifik özellik taşımaktadır. Fakat polimorfizm oranının çok yüksek olması sonuçların yorumlanmasında çeşitli zorluklara neden olmaktadır(22). 16S rRNA ve 16S-23S rRNA bölgesinin sekans sonucuyla ayırt edilemeyen mikobakteriler, rpoB, recA dizi analiziyle tanımlanabilmektedir. Ancak rpoB ve recA gen bölgeleri, 16S rRNA gen bölgesine göre daha sınırlı sayıda mikobakteri türünü tanımlayabilmektedir(90).

Mikobakterilerin DNA dizi analizi ile tanımlanmasında 16S rRNA gen bölgesinden sonra en sık kullanılan bölge hsp65 bölgesidir. Bu bölge mikobakterilerin tanımlanmasında 16S rRNA gen bölgesine alternatif olarak kullanılmaktadır(89). Hsp65 gen bölgesi sıklıkla PCR-RLFP yöntemiyle mikobakterilerin tanımlanmasında tercih edilmekteyken, dizi analizi ile mikobakterilerin tanımlanmasında da oldukça başarılıdır(88). 16S rRNA gen bölgesine oranla dizi uzunluğunun daha az olması hsp65'in avantajıdır(12). Turrene ve arkadaşları,

yaptıkları bir çalışmada *M. fortuitum* varyantı ile *M. senegalense*, *M. porcinum* ve *M. farcinogenes*'in 16S rRNA gen bölgesinin ilk 500 bazlık bölümünün %100 uyumlu olduğunu görmüşler ve 16S rRNA gen bölgesinin tamamının sekansının yapılmasını önermişlerdir(39). Riquet ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada *M. chelonae* ve *M. abscessus* türlerinin hsp65 bölgesinde 30 nükleotitik farklılık olmasına rağmen 16S rRNA bölgesinde 4 nükleotitik bir fark bulmuşlar ve TDM'lerin tanımlanmasında hsp65'in daha üstün olduğunu belirtmişlerdir(13). Biz de, 16S rRNA gen bölgesine göre daha kısa bir bölümün sekanslanarak tür tanımının yapılabilmesi ve yakın mikobakteri türleri arasında 16S rRNA bölgesine göre daha fazla polimorfizm göstermesi nedeniyle çalışmamızda hsp65 gen bölgesini tercih ettik.

DNA dizi analizi ile tür tanımı yaparken elde edilen diziler gen bankasındaki standart diziler ile karşılaştırılır ve bu standart dizilere göre uyum oranı değerlendirilir. Sekans analizi için en önemli unsur kullanılan referans verilerin güvenilirliğidir. Bu nedenle TDM türlerini tiplendirmek için yapılan çalışmalarda, araştırmacıların kendi referans verilerini oluşturmaları ve analiz edilen dizilerin bu verilerle karşılaştırma yapılarak tanımlanması önerilmektedir(39).

DNA dizi analizinde bir mikobakteri türünün tanımlanması için referans dizi ile tanımlanacak dizi arasındaki benzerlik oranının ne kadar olması gerektiği konusunda araştırmacılar arasında tam bir görüş birliği yoktur. Turrene ve arkadaşları diziler arasındaki %0,8-2 nükleotid farkının raporlanabilir benzerlik oranı olduğunu belirtmişlerdir(39). Cloud ve arkadaşları yaptıkları çalışmada %2'lik baz farkını kabul edilebilir oran olarak değerlendirerek kendi çalışmalarında kullanmışlardır ve tanımlama oranının iyi olmadığı durumlarda aranan türün en yakın benzerlik oranı gösteren türle ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir.(89). Hughes ve arkadaşları ise mikobakterilerin 16S rRNA sekans sonucuna göre %95 benzerlik oranı gösterebildiğini öne sürmüşlerdir(91). McNabb ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada hsp65 dizi analizinin, mikobakterilerin tanımlanmasında kesin, güvenilir sonuçlar verdiğini ve istisnaları olmakla beraber %97 ve üzeri benzerlik oranını kabul edilebilir tanımlama olarak belirtmişlerdir(12).

Çalışmamızda isolatlar hsp65 geninin 441 baz uzunluğundaki parsiyel kısmı hedef alınarak sekans analizi ile tanımlanmıştır. Tanımlanan isolatlardan 37 tanesi %100 uyumluluk, 111 tanesi %99, dört tanesi %98, bir tanesi %97, bir tanesi %95, bir tanesi %93 ve bir tanesi de %90 uyumluluk göstermiştir. Hsp65 dizi analizi sonucu %97 ve altında uyumluluk gösteren dört adet izolat saptanmıştır. Hsp65 dizi analiziyle düşük tanımlama

nedenlerine bakacak olursak literatürde bazı ihtimaller karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan biri, mikobakteri tanımlanmasında hsp65 gen bölgesinin DNA dizi analizi, 16S rRNA gen bölgesininkine göre daha yeni bir yöntemdir. Bu nedenle GenBank verilerinde, çeşitli mikobakteri suşlarının hsp65 gen bölgesine ait çok sayıda alternatif DNA dizilerinin bulunmama olasılığı vardır. Bu durum bize hsp65 dizi analiziyle düşük oranda uyumluluk görülebileceğini düşündürmektedir(39). Hsp65 dizi analizi sonucunda düşük oranda tanımlama görülmesinin diğer bir nedeni ise bölgesel varyasyona bağlı olarak aynı türlerin, aynı bölge DNA dizilerine ait verilerin GenBank’da bulunmama olasılığı olabilir(39,92). Benzerlik oranlarındaki bazı farklılıkların bir diğer nedeni ise, aynı türler arasındaki farklı varyasyonlara ait DNA dizilerinin GenBank verilerinde bulunması da olabilir(37). GenBank, suşlara ait gen dizilerinin karşılaştırılmasında 10 yılı aşkın süredir çalışmacılara hizmet vermektedir. İlk yıllarda GenBank’a girilen tam doğru olmayan sekans sonuçları ve sekans girişinin kalite kontrolünden yoksun olmasından dolayı bazı yanlış verileri de içerebilmektedir. Bu durum dizi karşılaştırmalarında ve tanımlamalarda çeşitli yanlış yorumlamalara ve düşük tanımlama oranlarına neden olmaktadır(7).

Yapılan çalışmalarda tespit edilen birçok yeni türe rağmen mikobakterilerin taksonomisi henüz tamamlanmış değildir. Tortoli’nin 2006’da yayınladığı makalesinde son üç yıl içinde 31 yeni mikobakteri türünün tanımlandığı ve bunların 26’sının insandan izole edildiği bildirilmiştir(57). Çalışmalarda dizi analiziyle yeni türler ortaya konulmakta ve bu türün standart dizilerinin veri bankalarında olmaması nedeniyle tanımlama yapılamaması veya düşük uyumluluk oranı ile tanımlama yapılması gibi ihtimaller söz konusu olabilmektedir(57).

Klasik tüberküloz ilaçlarına büyük oranda dirençli olmaları ve giderek artan sıklıkta izole edilmeleri nedeniyle, TDM enfeksiyonlarının doğru ve erken tanısı tedavi başarısı açısından çok önemlidir(6). *M. abscessus*, *M. genavense* ve *M. chelonae* gibi türlerin oluşturdukları enfeksiyonların çok zor tedavi edildiği bilinmektedir(93). Çalışmamızda incelemeye alınan 156 izolatı 15 farklı türün oluşturduğu saptanmıştır. Çalışmaya alınan izolatlardan en fazla sayıda tanımlanan tür 69 (%44,2) adet ile *M. abscessus* olmuştur. Bunu 26 (%16,7) izolatla *M. xenopi*, 17 (%10,9) izolatla *M. peregrinum* ve 13 (%8,3) izolatla *M. fortuitum* takip etmektedir. *M. abscessus* ve *M. xenopi*’nin, yıllara göre değişkenlik görülse de 2007-2008 yıllarında sıklıkla izole edildiği, 2004-2007 arasında hiç izole edilmeyen *M. peregrinum*’un ise 2010 yılında fazlaca izole edildiği görülmüştür. ABD’de yapılan çalışmalarda solunum yollarında en sık enfeksiyon etkeni olarak MAK tespit edilmiştir(24). Bizim çalışmamızda 6 (%3,8) izolat *M. intracellulare* ve 3 (%1,9) izolat *M. avium* olmak

üzere toplam 9 MAK üyesi tanımlanmıştır. İsrail’de 2004-2010 yılları arasında solunum yolu örneklerinden soyutlanan 215 izolat ile yapılan çalışmada en sık (%39,1) *M. xenopi* izole edilmiş, bunu %24,2 ile *M. simiae* takip etmiştir.(94). Bizim çalışmamızda da *M. xenopi* 26 izolat (%16,7) ile en sık ikinci saptanan tür olmuştur. Kanada ve İngiltere’de de en sık görülen türler arasında olan *M. xenopi*, ABD’de nadir görülen türlerdendir(94). Ülkemizde TDM sıklığı hakkında yapılan çalışmalar kısıtlıdır. İstanbul’da 2009-2010 yılları arasında yapılan bir çalışmada solunum yolu örneklerinden en sık %28 *M. abscessus* ve ikinci sırada %25 MAK izole edilmiştir(95). 2003 yılında yapılan bir çalışmada, klinik örneklerden izole edilen 17 TDM türünün 11’inin *M. gordonae* olduğunu saptamıştır(46). Engin ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada 102 örnekten izole edilen TDM’leri PCR-RFLP yöntemi ile tanımlayarak *M. gordonae*’yı en fazla izole edilen tür olarak saptamışlardır(96). Bizim çalışmamızda *M. gordonae* hiç izole edilmemiş ve en sık tanımlanan tür *M. abscessus* olmuştur. TDM’ler toprak ve su gibi ortamlarda yaygın olarak yaşar ve enfeksiyonların esas kaynağı bu ortamlardır. Bu nedenle merkezler arasındaki baskın türlerin farklılığının, çevre koşullarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir(54).

Çalışmamızda hsp65 DNA dizi analizi ile TDM türlerinin başarılı bir şekilde tanımlandığı görülmüştür. 153 izolat %97 ve üzeri benzerlik oranıyla tanımlanmıştır. Kalan üç izolat ise %95, %93 ve %90 uyumluluk oranları ile en yakın uyumlu olduğu tür olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda tanımlanan izolatların enfeksiyon etkeni olup olmadıkları araştırılmamıştır. Diğer birçok çalışmacı gibi biz de mikobakterilerin tanımlanmasında birden fazla sayıda gen bölgesinin, özellikle de 16S rRNA ve hsp65 bölgelerinin birlikte analiz edilmesinin düşük tanımlama veya tanımlanamama gibi sorunları çözeceğini düşünmekteyiz. Ancak genel olarak bir değerlendirme yaptığımızda, TDM’lerin tür düzeyinde tanımlanmasında hsp65 gen bölgesinin DNA dizi analizinin yapılması başarılı bir yöntem olarak görülmektedir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaşam süresinin uzaması, beraberinde immün sistemi baskılayan hastalıkların veya tedavi rejimlerinin yaygın şekilde görülmesini sağlamıştır. Bu nedenle çevrede yaygın olarak bulunan ve fırsatçı patojen olan TDM'ler giderek artan sıklıkta görülmektedir. TDM'lerin klasik antitüberküloz ilaçlara genelde dirençli olması nedeniyle hastalar gereksiz antibiyotikler almakta, tedavi olamamakta, hastanede kalış süresi ve ekonomik kayıplar artmaktadır. Bu nedenle mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması doğru tedavinin düzenlenmesi açısından çok önemlidir. Kuruma ait epidemiyolojik verilerin oluşturulması açısından da tür tanımının yapılması büyük önem taşımaktadır.

Çevrede yaygın olarak bulunan TDM'lerin hasta örneklerinden izole edilmesi sonrası tür düzeyinde tanımlama yapılarak sıklıkla etken veya kontaminant olabileceği ön değerlendirmesinin yapılabilmesi, tedavinin düzenlenmesi açısından önem taşımaktadır. Örneğin; MAK, *M. abscessus*, *M. fortuitum-chelonae* kompleks ve *M. ulcerans* gibi türlerin izole edilmesi sıklıkla enfeksiyon etkeni olduğunu düşündürürken, *M. gordonae*, *M. gastri* ve *M. asiaticum* gibi türler sıklıkla kontaminasyon ya da kolonizasyonla ilişkilidir. Ayrıca tedavi rejimleri bakımından da türler arasında farklılıklar görülmesi tür tayininin yapılmasını gerekli kılmaktadır.

Sonuç olarak hsp65 gen bölgesinin 441 bp parsiyel bölgesinin DNA dizi analizi TDM lerin tanımlanmasında yeterli ve uygundur.

9. KAYNAKLAR

1. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT. WHO. 2012;
2. Agustí G, Astola O, Rodríguez-Güell E, Julián E, Luquin M. Surface spreading motility shown by a group of phylogenetically related, rapidly growing pigmented mycobacteria suggests that motility is a common property of mycobacterial species but is restricted to smooth colonies. *J. Bacteriol.* 2008 Oct;190(20):6894–902.
3. Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, Feizabadi MM, Daei Naser A. Species identification of neglected nontuberculous mycobacteria in a developing country. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2011;64(4):265–71.
4. Alpaslan A. Non-Tüberküloz Mikobakteri Enfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı ve Duyarlılık Testleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun. 2003;388–96.
5. Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996 Apr;9(2):177–215.
6. Pang Y, Zhou Y, Wang S, Tan Y, Yue J, Zhao B, et al. Rapid molecular identification of mycobacterial species in positive culture isolates using the biochip test. *Int. J. Tuberc. lung Dis. Off. J. Int. Union against Tuberc. Lung Dis.* 2011;15(12):1680–5.
7. Cengiz Ç, Ajda T, Yusuf YE, Yeşer DK, Altınay B. Tüberküloz dışı mikobakteri izolatlarının tanımlanmasında {INNO-LiPA} mycobacteria, {INNO-LiPA} mycobacteriav2 ve hsp65 dizi analizinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol. Bul.* 2005;(39):437–45.
8. Çavuşoğlu Cengiz TE. Pigment oluşturan iki yeni mikobakteri izolatının tanımlanması. *Mikrobiyol. Bul.* 2006;(40):185–94.
9. Kim H, Kim S-H, Shim T-S, Kim M, Bai G-H, Park Y-G, et al. Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55(Pt 4):1649–56.
10. Da Costa ARF, Lopes ML, Furlaneto IP, de Sousa MS, Lima KVB. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010;68(4):390–4.
11. Soini H, Musser JM. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clin. Chem.* 2001;47(5):809–14.
12. McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, et al. Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene (hsp65) for Routine Identification of Mycobacterium Species Isolated from Clinical Sources. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(7):3000–11.

13. Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, et al. Hsp65 Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37(3):852–7.
14. Koneman EW, Allen SD JW et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins. 2006;5. ed:1064–1124.
15. Pinner M. Atypical acid fast microorganisms. *Am Rev Tuberc.* 1935;32:424–45.
16. Wayne LG, Sramek H a. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992 Jan;5(1):1–25.
17. Seber E. Tüberkülozun dünü. *ANKEM Derg.* 2010;24(Ek 2):52–60.
18. Aksu M. Tıp Tarihi Açısından Türkiye’de Verem Savaşı. *Türkiye Ulus. Verem Savaşı Dernekleri Fed.* 2007;161–70.
19. Daniel TM. *Captain of Death: The Story of Tuberculosis*. Univ. Rochester Press. 1997;s.1–8, s.9–60, s.61–100.
20. Kıyan M. *Mycobacteriaceae*, “Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.”Güneş Kitabevi, Ankara. 1999;s.419–57,.
21. 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 May 1;23(5):741–6.
22. Çavuşoğlu C. Mikobakterilerin taksonomisinde güncel gelişmeler. 6. Ulus. Mikobakteri Sempozyumu. 2006;183–8.
23. Çelik N. Tüberküloz dışı mikobakteriyel enfeksiyonlar. *Akciğer Arşivi.* 2000;3(1).
24. Munksgaard B. Nontuberculous Mycobacteria. *Am. J. Transplant.* 2004;4(3):42–6.
25. Köksal F. Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvar yapısı. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Sempozyum Kitabı. 2003;(Otak Form-Ofset Basım):34–47.
26. *Mycobacterium avium complex, spleen, photomicrograph, AFB stain.* www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_9b/c9b_mac_afb_spleen.htm.
27. Gedikoğlu S. *Mycobacterium tuberculosis*’in hücre yapısı. *İnfeksiyon Derg.* 1997;11:13–8.
28. Saniç A. Çoban AY. Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı. Nobel yayınları. 1999;13–9.
29. Metchock BG. Nolte FS. Wallace RJ. *Mycobacterium*. “Manuel of Clinical Microbiology” (8th ed.) (Ed. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Jorgensen JH). Am. Soc. Microbiol. Washing. DC. 2003;1:532–84.

30. Anderson R. J. The chemistry of the lipides of tubercle bacilli. *J. Biol. Chem.* 1929;83:169–75.
31. Asselineau J. Lederer E. Structure of the mycolic acids of Mycobacteria. *Nature.* 1950;166:782 – 783.
32. <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/roese-lars-2004-06-09/HTML/chapter1.html>.
33. Cafri U. Çevre Örneklerinden Mikobakteri İzolasyonu ve Tiplendirilmesi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim. Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Mersin. Uzm. Tezi. 2003;
34. Brosch R, Pym a S, Gordon S V, Cole ST. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol.* 2001 Sep;9(9):452–8.
35. Katoch V. mycobacteriaInfections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res.* 2004 Jan;61(1):290–304.
36. Holland SM. Nontuberculous mycobacteria. *Am. J. Med. Sci.* 2001 Jan;321(1):49–55.
37. Ninet B, Monod M, Emler S, Pawlowski J, Metral C, Rohner P, et al. Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J. Clin. Microbiol.* 1996 Oct;34(10):2531–6.
38. Tortoli E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy□: the New Mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003;16(2):319–54.
39. Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J. Necessity of Quality-Controlled 16S rRNA Gene Sequence Databases□: Identifying Nontuberculous Mycobacterium Species. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39(10):3637–48.
40. Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin. Infect. Dis.* 2001 Oct 15;33(8):1363–74.
41. Piersimoni C, Scarparo C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg. Infect. Dis.* 2009 Sep;15(9):1351–8; quiz 1544.
42. Leclerc MC, Haddad N, Moreau R, Thorel MF. Molecular characterization of environmental mycobacterium strains by PCR-restriction fragment length polymorphism of hsp65 and by sequencing of hsp65, and of 16S and ITS1 rDNA. *Res. Microbiol.* 2000 Oct;151(8):629–38.
43. Bland CS, Ireland JM, Lozano E, Alvarez ME, Primm TP, Icrobiol APPLNM. Mycobacterial Ecology of the Rio Grande. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(10):5719–27.

44. Uzun M. Su sistemleri ve çevreden izole edilen mikobakteriler ve bunları hastane infeksiyonları açısından önemi. 6.Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. Ankara,. 2006;97–104.
45. Kısa O. Su sistemleri ve çevreden mikobakterilerin saptanmasında analitik yöntemler. 6.Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. Ankara. 2006;105–18.
46. Bedir O. Hasta örneklerinden izole edilen tüberküloz dışı mikobakterilerin moleküler yöntemlerle tanımlanması. 2. Bedir O. Hast. örneklerinden izole Gülhane Ask. Tıp Akad. Ask. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klin. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Ankara. Uzm. tezi. 2003;
47. Good RC. Snider DE. Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States. *J Infect Dis.* 1982;146:829–33.
48. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott B a, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007 Feb 15;175(4):367–416.
49. Dailloux M, Abalain ML, Laurain C, Lebrun L, Loos-Ayav C, Lozniewski A, et al. Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients. *Eur. Respir. J.* 2006 Dec;28(6):1211–5.
50. Iseman MD. Buschman D. Ackerson L. Pectus excavatum and scoliosis: Throacic anomalies associated with pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium* complex. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144:914–6.
51. O’Brien RJ. Geiter LJ. Snider DE. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States: Results from a national survey. *Am Rev Respir Dis.* 1987;135:1007–14.
52. Marras TK, Chedore P, Ying AM, Jamieson F. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997 2003. *Thorax.* 2007 Aug;62(8):661–6.
53. Nightingale SD. Byrd LT. Southern PM. Incidence of *Mycobacterium avium*-intracellulare complex in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis.* 1995;165:1082–5.
54. Cook JL. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *Br. Med. Bull.* 2010 Jan;96:45–59.
55. Bicmen C, Coskun M, Gunduz AT, Senol G, Cirak a K, Tibet G. Nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: causative agent or not? *New Microbiol.* 2010 Oct;33(4):399–403.
56. Kocagöz T. *Mycobacterium Tüberculosis*’in Virülans Etmenleri. 5.Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. İzmir. 2004;111–24.
57. Tortoli E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006 Nov;48(2):159–78.

58. Walter R.Wilson, Merle A.Sande, İsmail Hakkı Dündar. Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi. Nobel Tıp Kitapevi. 2004;
59. Ruíz M, Rodríguez JC, Escribano I, García-Martínez J, Rodríguez-Valera F, Royo G. Application of molecular biology techniques to the diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. APMIS. 2001 Dec;109(12):857–64.
60. Lima DM, Bollela VR, Jácomo BJT, Martinez R, Lopes da Fonseca BA. Identification of mycobacterium species in contaminated cultures by polymerase chain reaction. Chest. 2005 Apr;127(4):1283–8.
61. Tortoli E, Bartoloni A, Erba ML, Levrè E, Lombardi N, Mantella A, et al. Human Infections Due to Mycobacterium lentiflavum. J. Clin. Microbiol. 2002;40(2):728–9.
62. Brown-elliott BA, Wallace RJ. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 2002;15(4):716–46.
63. Özkütük N. Klinik Materyalin Hastadan Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun. 2003;
64. Sarıgüzel N. Direk Mikroskopi Teknikleri ve Değerlendirilmesi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun. 2003;
65. Kent PT. Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a Guide for the level 111 laboratory U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. Centers Dis. Control. Atlanta, Ga. 1985;
66. Sürücüoğlu S. Mikobakteri İnfeksiyonlarının Tanısında Klasik Yöntemler, Standardizasyonu ve Önemi. Klimik XI. Türk Klin. Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hast. Kongresi. 2003;
67. Baylan O. Tüberkülozun kültüre dayalı tanı yöntemleri. Mikrobiyol Bul. 2005;39:107–10.
68. Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI). . Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Proposed Guideline. CSLI Doc. M48-P, Pennsylvania, USA. 2007;
69. Uzun M. Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. 2003;
70. Isenberg DH. Liquid media. Essentials procedures for clinical microbiology. Washington, D.C ASM Pres. 2000;183–7.
71. Tirma ARA, Atafı E, Dursun AB, Güler ZM, Gümüflü F, Sertkaya D. Akciğer Tüberkülozunun Erken Tanısında Lowenstein-Jensen (LJ) Besiyeri ile Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Toraks Derg. 2003;3–7.

72. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB , with or without Solid Media , for Detection of Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(5):2321–5.
73. Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos D a. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *J. Microbiol. Methods.* 2008 Sep;75(1):1–11.
74. Richter E, Rüscherdes S, Hillemann D, Ru S. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(5):69–75.
75. Somoskovi A, Mester J, Hale YM, Parsons LM, Salfinger M. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2002;23(3):585–97.
76. 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 Jul;58(Pt 7):900–4.
77. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31(2):175–8.
78. Bulut Y, Doymaz MZ. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ve Mikrobiyolojideki Önemi. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kitabı*, ed. R. Durmaz. 2001;
79. Özyurt M. Tüberkülozun laboratuvar tanısında kullanılan moleküler ticari tanı sistemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. 2003;
80. Safianowska A, Walkiewicz R, Nejman-Gryz P, Chazan R, Grubek-Jaworska H. [The comparison between two methods for typing of nontuberculous mycobacteria: high pressure liquid chromatography and molecular assay GenoType Mycobacterium CM/AS]. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2010 Jan;78(5):363–8.
81. Dai J, Chen Y, Dean S, Morris JG, Salfinger M, Johnson J a. Multiple-genome comparison reveals new loci for Mycobacterium species identification. *J. Clin. Microbiol.* 2011 Jan;49(1):144–53.
82. Van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2013 Feb;34(1):103–9.
83. Nyamogoba HDN, Mbuthia G, Mining S, Kikuvu G, Biegon R, Mpoke S, et al. HIV co-infection with tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in western Kenya: challenges in the diagnosis and management. *Afr. Health Sci.* 2012 Sep;12(3):305–11.
84. Aliyu G, El-Kamary SS, Abimiku A, Brown C, Tracy K, Hungerford L, et al. Prevalence of Non-Tuberculous Mycobacterial Infections among Tuberculosis Suspects in Nigeria. *PLoS One.* 2013 Jan;8(5):e63170.

85. Kendall B a, Winthrop KL. Update on the epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2013 Feb;34(1):87–94.
86. Kurtoğlu M. Tüberküloz Şüpheli Hastalardan Mycobacterium tuberculosis Kompleks İzolasyon Oranı ve Suşların BACTEC™ NAP ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Rapid™ Testleri ile Tanımlanması *Immunochromatographic. Mikrobiyol. Bul.* 2011;45(2):266–73.
87. Middleton AM. Disinfection of bronchoscopes , contaminated in vitro with Mycobacterium tuberculosis , Mycobacterium and Mycobacterium chelonae in sputum , using buffered peracetic (“ Nu-Cidex ”) acid solution. *J. Hosp. Infect.* 1997;137–43.
88. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R, et al. Identification of 54 Mycobacterial Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hsp65 Gene. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39(8):2799–806.
89. Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY, Jama M, Hillyard DR, et al. Identification of Mycobacterium spp . by Using a Commercial 16S Ribosomal DNA Sequencing Kit and Additional Sequencing Libraries. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(2):400–6.
90. Adékambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004 Nov;54(Pt 6):2095–105.
91. Hughes MS, Skuce R a, Beck L a, Neill SD. Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 1993 Dec;31(12):3216–22.
92. Ferdinand S, Legrand E, Goh KS, Berchel M, Mazzearelli G, Sola C, et al. Taxonomic and phylogenetic status of non-tuberculous mycobacteria in a Caribbean setting. *Mol. Cell. Probes.* 2004 Dec;18(6):399–408.
93. Petrini B. 16S rDNA sequencing in the species identification of Nontuberculous Mycobacteriian. *Scan J Infect Dis.* 2003;529–520.
94. 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 Jan;17(1):96–9.
95. Babalık A, Kuyucu T, Ordu EN, Ernam D, Partal M, Köksalan K. Non-tuberculous mycobacteria infection: 75 cases. *Tuberk. Toraks.* 2012 Jan;60(1):20–31.
96. Ergin A. Kocagöz T. Polimeraz zincir reaksiyonu-Restriksiyon enzim analizi ile Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması. *Mikrobiyol Bul.* 1999;251–61.