



**T. C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

**DÜZCE İLİ İÇME VE KULLANMA SULARINDA ATİPİK
MİKROBAKTERİLERİN İZOLASYON VE TANIMLANMASI**

DURSUN ATİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ**

DÜZCE 2017

Form:6

KABUL VE ONAY

Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

“Düzce İli İçme Ve Kullanma Sularında Atipik Mikobakterilerin İzolasyon Ve Tanımlanması”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 25/07/2017

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Sükrü OKSÜZ

Düzce Üniversitesi

Başkan



Prof. Dr. Erol AYAZ

Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye



Yrd. Doç. Dr. Emel ÇALIŞKAN

Düzce Üniversitesi

Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 26/07/2017 tarih ve 2017/sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adnan ÖZÖZTİN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tarih

Dursun ATİK

ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR SAYFASI

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ve bu tezin hazırlanması süresince gösterdiği ilgi ve yardımlarından dolayı danışmanım Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ hocama teşekkür ederim.

Yine yüksek lisans hocalarım Prof. Dr. İdris ŞAHİN, Prof. Dr. C.Elif ÖZTÜRK ve Yrd. Doç. Dr. Emel ÇALIŞKAN'a teşekkür ederim.

Düzce Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışan Biyolog ve laborant mesai arkadaşlarıma ve bölümümüzün asistan doktorlarına teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olan canım eşime, bir tanecik kızıma teşekkür ederim.

Ayrıca benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan aileme teşekkür ederim.

Dursun ATİK

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR SAYFASI.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	v
ŞEKİL RESİM GRAFİK VE TABLOLAR LİSTESİ	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	4
2.GENEL BİLGİLER	6
2.1.Mikobakterilerin Sınıflandırılması	7
2.1.1. Runyon sınıflandırması	9
2.1.1.1. Sınıf I- Fotokromojenler	9
2.1.1.2.Sınıf II- Skotokromojenler	9
2.1.1.3. Sınıf III- Nonfotokromojenik'ler	10
2.1.1.4. Sınıf IV- Çabuk üreyenler	11
2.2. Mikobakterilerin Hücre ve Kimyasal Yapıları	11
2.2.1. Mikobakteriyel Antijenler	13
2.2.2 Mikobakteriyel proteinler.....	14
2.2.3.Mikobakteriyel Polisakkaritler	14
2.2.4.Mikobakteriyel lipidler.....	14
2.2.4.1.Trehaloz glikolipidler (Cord faktör).....	14
2.2.4.2.Sülfatidler.....	15
2.2.4.3.Fosfatidil inositol monomannozidler (PIM) ve oligomannosidler	15
2.2.4.4.Wax D ve muramildipeptid.....	15
2.3. Mikobacterium tuberculosis complex türlerinin filogenetik bağları	15
2.4.Mikobakteriumların Genetik Yapısı.....	16
2.5.Mikobakteri İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri	17
2.5.1. Sıvı Besiyerleri.....	17
2.5.2. Katı Besiyerleri	20
2.5.2.1. Yumurta Bazlı Besiyerleri	20
2.5.2.2 .Agar Bazlı Besiyerleri.....	21

2.5.2.3. Selektif Besiyerleri.....	21
2.6. Mikobakterilerin Çevre Koşullarına Dayanıklılıkları	22
2.7. Mikobakterilerin Sularda Bulunmasını Etkileyen Başlıca Özellikler	23
2.8. NTM Enfeksiyonu ve Patogenez.....	25
2.9. Yalancı Pozitiflik ve Kolonizasyon	27
2.10.Non-Tüberküloz Mikobakteri İdentifikasyonlarında Laboratuvar Tanısı	27
2.10.1.NTM Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Biyokimyasal Testler	29
2.10.2.NTM Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1.Gereçler	37
3.1.1. Kullanılan sarf malzemeler	37
3.1.2.Bakteriyolojik Cihazlar	37
3.1.3 Kullanılan Besiyeri, Boya ve Kimyasallar.....	37
3.2 Yöntem	41
3.2.1.Su örneklerinin toplaması	41
3.2.2.Örneklerin pH ve klor miktarlarının belirlenmesi.....	41
3.2.3.Örneklerin izolasyonu	42
3.2.4 Örneklerin kültür işlemleri ve identifikasyonu	42
3.2.4.1 Aside Dirençli Bakterilerin Boyanması	44
3.2.4.2 Gen izolasyonu ve İdentifikasyonu.....	44
3.3. İstatistiksel değerlendirme	49
4. BULGULAR	50
5.TARTIŞMA	65
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	74
7.KAYNAKLAR.....	75

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ARB	Aside dirençli bakteri
AIDS	Edinilmiş bağışıklık yetmezlik sendromu
MÖ	Milatan önce
CD4	Yardımcı T lenfositleri
CD8	Sitotoksik C lenfositleri
CFTR	Kistik fibroz transmembran iletim düzenleyicisi
Tb	Tüberküloz
DNA	Deoksiribonükleik asit
EZN	Ehrlich Ziehl – Neelsen
G+S	Guanin + Sitozin
Ppm	Permits per million (milyonda bir parçacık)
µm	Mikrometre
GLC	Gaz - likid kromatografisi
GM – CSF	Granülosit – makrofaj koloni stimüle edici faktör
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
INF	İnterferon
LJ	Löwenstein – Jensen
PCR	Polymerase chain reaction
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> kompleks
MIRU	Mikobakteri tekrarlayan üniteleri
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi
NaOH	Sodyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
OADC	Oleik asit – dekstroza – katalaz
NTM	Nontüberküloz mikobakteri
PZA	Pirazinamid
PVC	Polivinil klorid
PPG	Prolin – prolin – glutamat
PG	Prolin glutamat
REA	Restriksiyon enzim analizi

rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
T2H	Tiyofen-2 karboksilik asit hidrazid
TNF- α	Tümör nekrotize edici faktör alfa
UV	Ultraviyole



ŞEKİL RESİM GRAFİK VE TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Runyon sınıflandırması.....	8
Tablo 2. PCR çalışma döngüsü	46
Tablo 3. Örneklerin dağılımını gösteren tablo.	50
Tablo 4. Örneklerin pH sıcaklık ve serbest klor miktarları.....	52
Tablo 5. Örneklerin klor miktarına göre dağılımı.....	55
Tablo 6. NTM izole edilen su örneklerinin pH, sıcaklık ve klor miktarları.....	56
Tablo 7. Pozitif örneklerin dağılımı	57
Tablo 8. İzole edilen NTM kökenlerinin üremesinin olduğu besiyerleri.....	58
Tablo 9. PCR sonrasında yapılan hibridizasyon sonuçlarının CM ve AS stripleri ile gösterilmesi	59
Şekil 1 Mikobakterilerin hücre duvar yapısı	12
Şekil 2 Mikobakteri porin yapısı	13
Şekil 3. M. tuberculosis kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki	15
Şekil 4. Geno Type Mycobacteria CM ve AS stripleri ve prob bölgeleri	47
Şekil 5. Geno Type Mycobacteria CM kiti ile çalışılan mikobakteri bant bölgeleri.....	48
Şekil 6. Geno Type Mycobacteria AS kiti ile çalışılan mikobakteri bant bölgeleri.....	49
Grafik 1. Toplam örnek dağılımı	51
Grafik 2. Örneklerin pH değerleri gösterilmektedir.	55
Resim 1. Üreme olan besiyerlerinden alınarak yapılan EZN görünüşleri.	60
Resim 2. a) <i>M.fortuitum</i> b) <i>M.chelonae</i> c) <i>M.peregrinum</i> kolonileri.....	61
Resim 3. a) <i>M.lentiflavum</i> b) <i>M.gordonae</i> c) <i>M.szugai</i> kolonileri gösterilmiştir.....	61
Resim 4. a) <i>M.fortuitum</i> b) <i>M.chelonae</i> c) <i>M.peregrinum</i>	62
Resim 5. a) <i>M.lentiflavum</i> b) <i>N.gordonae</i> c) <i>M.szulgai</i>	63

ÖZET

DÜZCE İLİ İÇME VE KULLANMA SULARINDA ATİPİK MİKOBAKTERİLERİN İZOLASYON VE TANIMLANMASI

Mycobacterium tuberculosis kompleksi dışında kalan tüm mikobakteriler tüberküloz dışı mikobakteriler diye bilinir. NTM'ler çevrede yaygın olarak bulunmakta olup insan enfeksiyonlarının çoğunda bulaş kaynağının su olduğu kabul edilmektedir. Bu çalışmada Düzce bölgesinde içme kullanma sularında NTM varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla Düzce bölgesinde çeşitli şebeke suyu, depo suyu, kaynak suyu ve çeşme suyu kaynaklarından 120 farklı su örneği alınmıştır. Örnekler steril 1(bir) litrelik kaplara, aynı kaynaktan iki steril kap olacak şekilde alınmış ve alınırken su sıcaklıkları ölçülerek kaydedildi. Bu şekilde laboratuvara ulaştırılan numunelerinin klor ve pH'larının ölçüldü. Daha sonra örnekler önce bir düzenek vasıtasıyla filtrasyon, ardından dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır, sonra düzeneğe kullanılan filtreler steril bir öze ve steril bir pens yardımı ile alınarak LJ, Middlebrook 7H11 ve MGİT besiyerlerine yerleştirilerek ekim işlemi tamamlandı. Besiyerlerinde üreme varlığı 5-7 gün aralıklarla takip edildi. Örnekler, LJ ve Middlebrook 7H11 agar besiyerlerinde sekiz hafta sonuna kadar, MGIT besiyeri ise altı hafta boyunca izlendi. Bu sürenin sonunda üreme sinyali vermeyen MGIT besiyerleri değerlendirmeye alınmadı. Üreme sinyali veren MGIT besiyerlerinden yada koloni oluşumu gözlenen LJ ve Middlebrook 7H11 besiyerlerinden alınan mikroorganizmalar aside dirençli boyama (ARB) yöntemi ile asido-rezistans bakteriler varlığı açısından incelendi. Asido rezistans boyanma özelliği göstermeyen numuneler kontaminant olarak değerlendirildi. Aside dirençli olarak izole edilen mikroorganizmlara GenoType Mycobacteria CM ve GenoType Mycobacteria AS kitleri kullanılarak moleküler yöntemlerle identifikasyonu yapılmıştır. İdentifikasyonu yapılan örneklerin dokuz tanesi *M.fortuitum*, üç tanesi *M.gordonae*, üç tanesi *M.szulgai*, iki tanesi *M.lentiflavum*, iki tanesi *M.chelonae*, bir tanesi ise *M.pregrinum* olarak tanımlanmıştır.

Sonuç olarak NTM'lerin kaynaklarına yönelik epidemiyolojik çalışmaların sınırlı olduğu ülkemizde, araştırmamızın hem bölgemiz hem de ülkemiz için önemli olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca araştırmamızda ülkemizde daha önce benzer çalışmalarda hi bildirilmeyen NTM kkenlerinden *M. szulgai*'nin saptanması bu tr alışmaların yapılmasının ve sayıca da arttırılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Non tüberküloz mikobakteri (NTM) , Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Su,Dzce



ABSTRACT

IDENTIFICATION AND ISOLATION OF ATYPICAL MYCOBACTERIA FROM DRINKING AND USING WATER IN DÜZCE.

All mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* complex are known as non-tuberculous mycobacteria. NTMs are commonly found or can be found in water in the majority of human infections. In this study, the presence of NTM was investigated in the waters where drinking was conducted in the flat zone. For this purpose, 120 different water samples were taken in various municipal water, storage water, spring water and tap water sources in Düzce. Samples were stored in sterile 1 (one) liter containers, measuring the same leakage. They can reach the laboratory in this way, measuring the chlorine and pH of the samples. Later, the decontamination procedure was once again applied to the specimens, and in the apparatus, the seeds were placed in LJ, Middlebrook 7H11 and MGIT mediums with the aid of a sterile device and a sterile syringe. The medium was filled in 5-7 days intervals. The samples were monitored for up to eight weeks in LJ and Middlebrook 7H11 agar media and six weeks in MGIT medium. MGIT mediums that did not produce a reproductive signal at the end of this study were not evaluated. The microorganisms from LJ and Middlebrook 7H11 medium, which show colony formation from the hope signaling MGIT medium, or aside resistance bacteria (ARB) method aside from the presence of microorganisms. Samples without aside resistance staining were evaluated as contaminants. The microorganisms isolated from the genus *Escherichia coli* are genotypically characterized by molecular methods such as GenoType Mycobacteria CM and GenoType Mycobacteria AS. Nine of the samples were identified as *M. fortuitum*, three as *M. gordonae*, three as *M. szulgai*, two as *M. lentiflavum*, two as *M. chelonae* and one as *M. pregrinum*.

As a result, epidemiological studies on the sources of NTM In our country, where we are limited, we are thinking of things that are important for our country as well as our region. The discovery of *M. szulgai* from the NTM origins reveals the necessity of carrying out such studies and of multiplying them.

Key words:Non-tuberculous mycobacteria (NTM), Polymerize chaing reaction (PCR), Water, Duzce

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Mycobacterium tuberculosis kompleks dışında kalan tüm mikobakteriler, nontuberculos mycobacteria (NTM) diye bilinir. Çoğu insanda hastalık oluşturmeyen bu grup bakterilerin 50'den fazla türü bulunmaktadır. Bunlardan birkaç NTM türü hem immun sistemi baskılanmış hem de normal olan konakda hastalık meydana getirmektedir. Eskiden NTM ile oluşan enfeksiyonlar, hastalığın bulunduğu yer ve etkeni dikkate alınmaksızın “atipik tüberküloz” olarak değerlendirilirken, günümüzde, her NTM türünün virulansı, enfeksiyonun yeri ve özel tedavi yöntemleri klinik gidişi yönlendirmektedir¹.

NTM, su, toprak, besinler, toz ve aerosollerini içeren doğal ekosistemlerde yaygın olarak bulunur ve çevresel kaynaklardan insana, inhalasyon, inokülasyon veya sindirim yoluyla bulaşabilirler^{1,2}.

Endüstrileşmiş dünyanın değişik bölgelerinde, NTM'in neden olduğu enfeksiyonların sayısı giderek artmaktadır². Non tüberküloz mikobakterileri insan vücudunda kolonizasyon ve/veya enfeksiyonlara yol açtığını bildiren çok sayıda çalışma vardır³

Sıcak ve soğuk su sistemlerinde yaygın olarak bulunan bu mikroorganizmalar biyofilim oluşturma^{4,5} klor ve dezenfektanlara direnç^{6,7} düşük düzey oksijen varlığında⁸ ve organik madde⁹ içeren sularda üreyebilme, geniş pH-ısı aralığında canlı kalma gibi özellikleri sayesinde su sistemlerinde yaşamlarını sürdürebilmektedir^{4,10}.

İnsanlar, su ile yiyecek-içecekler aracılığıyla gastrointestinal yoldan veya duş alırken ve temizlik yaparken aerosollerin inhalasyonu ile NTM'lere maruz kalmaktadır. Sularda bulunan NTM'ler, vücuda giriş yoluna ve konağın bağışıklık durumuna bağlı olarak hastalık oluşturmada kolonize olabilmekte ya da akciğerler başta olmak üzere çeşitli organlarda diseminasyon enfeksiyona neden olabilmektedir⁴.

Sağlık Bakanlığının Türkiye’de Verem Savaşı 2009 Raporu’na göre kayıtlı tüberküloz hastalarının toplam sayısı 2006 yılında 20.526 iken 2007 yılında 19.694 olmuş ve bir yılda % 4 düşüş görülmüştür. Kayıtlı 19.694 hastanın 17.781’i (% 90,3) yeni olgu, 1.913’ü (% 9,7) tedavi görmüş olgudur. Bu hastaların % 20,8’inde en az bir antitüberküloz ilaca direnç tespit edilirken, % 4,9’unda çok ilaca dirençli etken

bulunmuştur¹¹. Bu oranlar diğer ülkeler ile karşılaştırıldığında azımsanmayacak bir değerdir¹².

Bu çalışmada daha önce bölgemizde yapılmamış ve önemli bir bulaş kaynağı olan sulardaki NTM sıklığı incelenecektir. Bu sayede bilimsel dünyaya epidemiyolojik yeni veri girişi sağlanacaktır. Ayrıca halk sağlığının korunması ve NTM'lerle oluşacak enfeksiyonların önlenmesine katkı yapacaktır. Elde edilecek epidemiyolojik verilerle bu etkenlerle meydana gelecek hastalıkların tanısının erken ve doğru konması sağlanacaktır. Bu sayede gereksiz tedaviler ve bu gereksiz tedavilere bağlı antitüberküloz ilaçlara direnç gelişimi önlenecek, böylece hastaların hasta maliyeti düşürülecek ve ülke ekonomisine katkıda bulunulacaktır.



2.GENEL BİLGİLER

Etimolojik olarak, “*Mycobacterium*”, Yunanca mantar (myces) ve küçük çubuk (bakterion) kelimelerinin birleşmesinden köken almaktadır. Tüberküloz, köken olarak küçük, patates benzeri (“tuber”), endurasyon yapan anatomik lezyonlar için kullanılmaktadır. Hastalığın tüberküloz olarak adlandırılması, 1839 yılında Johann Lukas Schoenlein tarafından yapılmıştır¹³. Almanya’da bulunan ve M.Ö. 8000 yılına ait insan iskelet kalıntılarının hastalık izi taşıdığı saptanmıştır¹⁴.

Tüberkülozun klinik bulgularının ve epidemiyolojik özelliklerinin ilk sistematik tanımlanması M.Ö. 400–350 yılları arasında Hipokrat koleksiyonunda kayıtlıdır. İlk olarak Aristo (M.Ö. 354–322) bu hastalığın bulaşıcı olduğunu düşündüren bir paternin farkına varmıştır. Pierre Desault (1675–1737) hastalığın bulaşıcı olduğunu, temel bulaştırıcı unsurun ise balgam olduğunu belirtmiştir. Pierre Charles Alexander Louis diğer nedenlerle ölen hastaların akciğerlerinde latent tüberküloz delillerini bulmuştur. Robert Koch 1882 yılında tüberkülozdan ölen bir hastanın akciğerindeki lezyonlarda basili göstermiş, bunu kültürde üretmiş ve üretilen basil ile deney hayvanlarında tüberküloz oluşturmuştur¹⁴.

Mycobacterium cinsi; *Actinobacteria* sınıfı, *Actinomycetales* takımı, *Mycobacteriaceae* ailesi içinde sınıflandırılmaktadır. Bu cinste bulunan türlerden *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) kompleksi üyeleri ve *Mycobacterium leprae* (*M.leprae*) insanda hastalık yapan en önemli cinslerdir. NTM’ler olarak adlandırılan diğer mikobakteriler ise çevrede serbest yasayan, saprofit veya fırsatçı patojen olabilen türleri kapsamaktadırlar^{15,16,17}.

Mycobacteriaceae familyasına bağlı tek genus olan *Mycobacterium* genusu içinde, alt türlerle birlikte 2008 Haziran ayında LPSN (*list of prokaryotic names with standing in nomenclature*) tarafından yayınlanan listeye göre 130 *Mycobacterium* cinsi ve 11 alt türü bulunmaktadır¹⁸. Bu cins kapsamında sınıflandırılan türlerin ortak özellikleri: aside dirençli boyanmaları, 60 ile 90 karbonlu mikolik asit içermeleri ve deoksiribonükleik asit (DNA)’lerindeki yüksek oranda (%61-71) Guanin+Sitozin (G+S) varlığıdır¹⁶⁻¹⁹.

Mikobakteriler, aerobik, spor oluşturmeyan, hareketsiz, hafif kıvrık, pleoformik çomak veya kokoid şeklinde, 0,2-0,6 x 1.0-10 µm boyutlarında mikroorganizmalardır. *Mycobacterium* cinsi bakterilerin yavaş üremeleri yanında hücre duvarlarında bol miktarda lipid bileşikleri bulundurulur²⁰.

Mikobakteriler asido-rezistans bakteriler (ARB) olarak bilinirler. Bu özellik, hücre duvarında mikolik asit, peptidoglikan ve arabinomannan'ın oluşturduğu kalın ve koruyucu tabaka ile ilişkilidir. Anilin boyası bu tabaka ile bağ oluşturarak asit ve alkol etkisine karşın yerinde kalır. Bu özelliği ortaya çıkarmada özel bir boyama yöntemi olan Erlich-Ziehl-Neelsen ile asid-fast boyama yöntemi kullanılır. Bu boyamada mikobakteriler, mavi zemin üzerinde kırmızı renkte görünürler. Gram boyama ile kolay boyanmamalarına rağmen Gram pozitif olarak kabul edilebilir⁵⁷. Bunun sebebi kapsül benzeri dış tabakanın uzaklaştırılması halinde Gram pozitif gibi boyanmalarıdır¹⁶. Ortamda %5-10 CO₂'nin bulunması aerop olan tüberküloz bakterilerinin üremesini hızlandırır. Optimal üreme derecesi 37 (30-42) °C'dir. Basit karbon kaynaklarının oksidasyonu ile enerji sağlayabilirler²¹.

Mycobacteriaceae familyasına bağlı üyeler klasik ve Runyon olmak üzere iki farklı şekilde sınıflandırılır. Klasik sınıflandırma *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, MBTC), *M. leprae* ve NTM olarak üç grupta incelenir²². Ernest Runyon tarafından ise 1958 yılında Loewenstein Jensen (LJ) besi yerindeki üreme hızı, koloni morfolojisi ve pigment üretimindeki renk değişimlerine göre 4 (dört) grupta toplanmıştır²³.

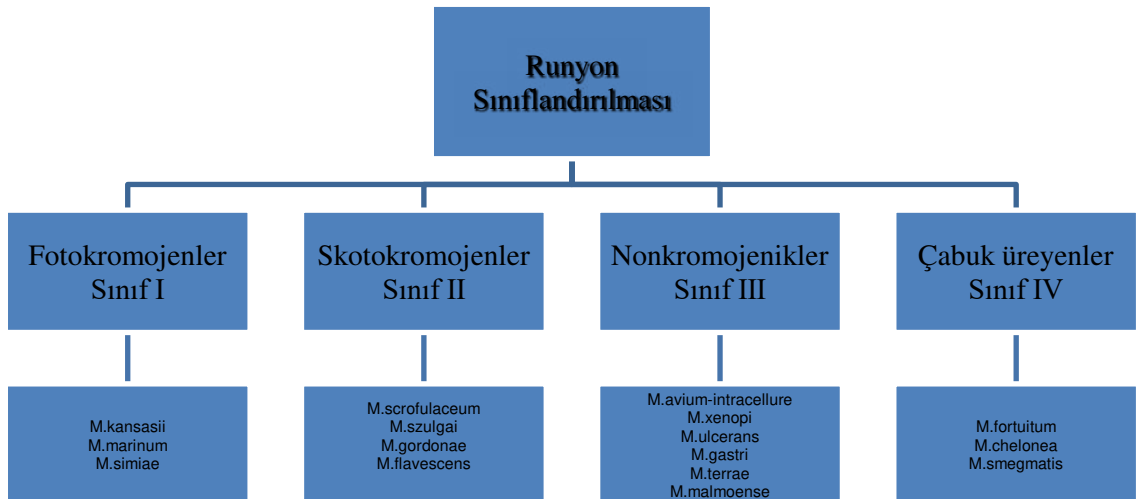
2.1.Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Runyon'un sınıflandırılması klinik mikrobiyoloji yönünden büyük önem taşıyorsa da bakterilerin identifikasyonunda yarar sağlar²¹. İnsanlar ve diğer memelilerde tüberküloz enfeksiyonuna neden olan ve %95'in üzerinde DNA homolojisi gösteren türler MTBC içinde sınıflandırılmaktadır. Bu türler; *M.tuberculosis*, *M.bovis* (*M.bovis* subsp.bovis, *M.bovis* subsp. caprae ve *M.bovis* *Bacille Calmette Guerin*), *M.africanum*, *M.microti*, *M.canettii* ve *M.pinnipedii*'dir^{24,25}. MTBC içerisinde bulunan türler ile *M.leprae* haricindeki tüm mikobakteriler NTM'ler olarak isimlendirilirler²⁴.

İnsanlar için patojen olanlar *M. tuberculosis* kompleks ve *M. leprae* dışında potansiyel fırsatçı patojenler olarak; *Mycobacterium avium-intracellulare* (*M. avium-intracellulare*), *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*), *Mycobacterium fortuitum-chelonae* kompleksi (*M. fortuitum-chelonae* kompleksi), *Mycobacterium szulgai* (*M. szulgai*), *Mycobacterium malmoense* (*M. malmoense*), *Mycobacterium simiae* (*M. simiae*), *Mycobacterium marinum* (*M. marinum*), *Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*), *Mycobacterium hemophilum* (*M. hemophilum*) yer almaktadır. Yavaş üreyenlerden saprofit olup, çok nadir olarak insanlarda da hastalık yapabildikleri gösterilen; *Mycobacterium gordonae* (*M. gordonae*), *Mycobacterium asiaticum* (*M. asiaticum*), *Mycobacterium terrae-triviale* (*M. terrae-triviale*) kompleksi *Mycobacterium gastri* (*M. gastri*), *Mycobacterium non-chromogenicum* (*M. non-chromogenicum*), *Mycobacterium para-tuberculosis* (*M. para-tuberculosis*), orta hızla üreyenlerden; *Mycobacterium flavescens* (*M. flavescens*), ve çabuk üreyenlerden; *Mycobacterium thermoresistibile* (*M. thermoresistibile*), *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*), *Mycobacterium vaccae* (*M. vaccae*), *Mycobacterium parafortuitum* (*M. parafortuitum*), kompleksi ve *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) bulunur²¹.

Runyon sınıflandırılmasında üreme hızı, koloni morfolojisi ve pigmentasyon esas alınarak dört grupta incelenen mycobacteriumun önemlilerinin özelliklerine ayırımı Tablo 1 de gösterilmiştir⁷.

Tablo 1. Runyon sınıflandırması



2.1.1. Runyon sınıflandırması

2.1.1.1. Sınıf I- Fotokromojenler

Bu mikroorganizmalar yavaş üreyip, ışıkla temas ettiklerinde pigmentli (sarı) koloniler oluştururlar²⁶. Karanlıkta üretildiklerinde kolonileri pigmentsiz oldukları halde, yapay veya doğal ışıktaki 1-8 saat bırakıldıklarında yeniden karanlıkta üretilseler bile portakal sarısı renginde, karotenoid pigment oluştururlar²⁰. Yavaş ürerler, kolonilerin görülebilmesi için 7 (yedi) günden fazla zamana gereksinim vardır. Bu grupta bulunan türler arasında *M. simiae*, *M. kansasii* ve *M. Marinum* gibi bakteriler vardır²⁶.

M. marinum; Bu mikroorganizmalar aside dirençli ve kesik boyanma gösterebilen çomakçıklardır. LJ besiyerinde en erken 7 (yedi) günde S veya R biçiminde koloniler oluştururlar. Bir saat kadar ışığa tutulduklarında önce limon sarısı renk alırlar. Işığa sürekli olarak tutulduklarında turuncu-kırmızı renk oluştururlar. Yüzme havuzlarında ve akvaryum duvarlarında bulunabilirler. İnsanlara derideki tarvmatik yaralardan bulaşıp yüzme havuzu granüloması adı verilen enfeksiyona neden olurlar²¹.

M.kansasii; fotokromojen ve asidorezistan olup preparatlarda uzun kalın çomakçıklar biçiminde görülürler. Bakteriler 37 °C' de bir haftada ürerler. LJ besiyerinde koloniler S veya R tipinde görülürler. İnsanlarda tüberküloza benzer akciğer enfeksiyonları, nadiren servikal ve diğer bölgelerde lenfadenitler, osteomyelit, tenosinovit ve yumuşak doku enfeksiyonları oluştururlar²¹.

M.simiae; kültürlerde en erken 7 günde ürerler. LJ ve middlebrook besiyerindeki koloniler S tipindedir. Pigment oluşturabilmesi için kolonilerin 4-8 saat ışıktaki tutulmaları ve sonra uzunca süre enkübe edilmeleri gerekir²¹.

2.1.1.2.Sınıf II- Skotokromojenler

Işığa bağlı olmadan sarı veya portakal renkli pigmentli koloniler meydana getirirler ve yavaş ürerler. Bu grupta bulunan türler arasında *Mycobacterium lentiflavum* (*M.lentiflavum*), *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* ve *M.xenopi* gibi mikroorganizmalar bulunur²⁶.

M.lentiflavum; LJ besiyerinde 22-37°C'de üremekte ve S tipi koloni oluşturmaktadır, Kolonilerinde sarımsı pigment oluşumu gözlenmektedir. Biyokimyasal özellikleri açısından *M.avium'a* benzemektedirler. Filogenetik açıdan ise *M.simiae* ve *M.genavense'ye* yakın olarak bilinen bir türdür^{27,28}.

M.gordonae ; toprak ve suda çok yaygın olarak bulunurlar ve musluk suyu basili olarak da isimlendirilirler. *Mgordonae* en iyi 37°C'de üreyen ve S tipi koloni oluşturan bir mikroorganizmadır²⁷. Genellikle sulara bağlı olarak yalancı infeksiyonlara ve salgınlara neden olabilmektedir. Günümüzde *M.gordonae'nin* patojen olmayan, sadece kolonizasyona neden olan bir tür olmadığı, infeksiyon da oluşturabildiği bilinmektedir. İmmün yetmezlik olan hastalarda dissemine infeksiyon, akciğer infeksiyonu, menenjit, prostetik aortik kapak endokarditi, üriner sistem infeksiyonu ve eklem infeksiyonuna neden olabildiği bildirilmiştir^{6,25,29}.

M.scrofulaceum; kısıklı-uzunlu bazen flamanlı, asidorezistan çomaklardır.Yumurtalı besiyerinde koloniler en erken 7 (yedi) günde ortaya çıkar. Koloniler sürekli ışıpta kaldıklarında tuğla kırmızısı rengine kadar koyulaşırlar. Düzgün, yeşil-turuncu kolonilerdir. Daha çok küçük çocuklarda, genellikle sub mandibuler tek lenf bezi veya bir lenf bezi kümesini tutan lenfadenitler oluştururlar²¹.

M.szulgai; boyları 1-4 mikrondur. 37°C de skotokromojen, 25°C de fotokromojendir. Besiyerlerinde S , R ve piramit biçiminde koloniler yaparlar²¹.

2.1.1.3. Sınıf III- Nonfotokromojenik'ler

Karanlıkta uzun süre kaldıklarında bazen soluk renkte pigment oluşturabilirlerse de uzun süre ışıpta tutulsalar bile pigment yapmazlar ya da önceden oluşmuş pigment koyulaşmaz²¹. Işıpta çok az pigmentli veya pigmentsizdirler ve yavaş ürerler. Bu grupta bulunan türler arasında *M. intracullulare*, *M. ulcerans*, *M.xenopi* gibi bakteriler bulunur²⁶.

M. avium-intracellulare; Boyanma ve morfoloji bakımından *M.tuberculosis*'e benzerlik gösterirler. Kok şekillerinden uzun çomaklara kadar görünüm verirler. Yumurtalı besiyerinde kubbe ve piramit şeklindeki kolonileri en erken 10 günde oluşur. 25-45 derecelerde üreyebilirler. Bazen kolonileri R biçiminde olabildiği gibi aynı kültürde değişik kolonilerde oluşturabilirler. Fırsatçı patojenler olarak insanlarda akciğer tüberkülozuna benzer hastalıklar, lenfadenitler oluşturabilirler. AİDS hastalarında bu bakterilerin çeşitli ve yaygın enfeksiyonları görülebilir²¹.

M.xenopi; çok uzun flamanlı asidorezistan çomaklardır. Yumurtalı besiyerinde iki haftada ortaya çıkan S tipinde pigmentsiz koloniler oluştururlar. Koloniler beklemekle sarımsı renk alırlar²¹.

M.ulcerans; Asidorezistan çomaklar olup 30-33 °C’lerde çok yavaş (28-60 günde) üreme özelliği gösterirler. Oluşan koloniler trans paran, küçük kubbe şeklinde, sonradan R tipi ve basıklaşan kolonilerdir. Ekstremitelerde yayılma eğilimi gösteren ülser oluştururlar²¹.

2.1.1.4. Sınıf IV- Çabuk üreyenler

Değişken pigmentasyon gösterirler, hızlı ürerler ve genellikle yedi günde koloniler gözle görülebilecek duruma gelirler. Bu grupta bulunan türler arasında *M.peregrinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* gibi bakteriler bulunur²⁶.

M.fortuitum; yaklaşık 1-3 mikron boyunda bazen kokoid, bazende dallanan falamanlı şekilleri bulunan asidorezistan bakterilerdir. Yumurtalı besiyerinde, beş günden az bir zamanda yumuşak, tereyağımsı kıvamda, yarım küre ve bazen rozet biçiminde veya R tipinde koloniler oluştururlar. Pigment yapmazlar. Akciğer enfeksiyonları ve soğuk abselerden soyutlanabilirler. Doğada yaygın olarak bulunurlar²¹.

M.peregrinum ; pigment oluşturmayan bu bakteriler ameliyat sonrası gelişen kutanöz enfeksiyon, disemine enfeksiyon, yumuşak doku enfeksiyonu ve AIDS’li hastalarda meydana gelen lenfadenit ve solunum sistem enfeksiyonundan olarak izole edilmiştir^{30,31,32,33,34}.

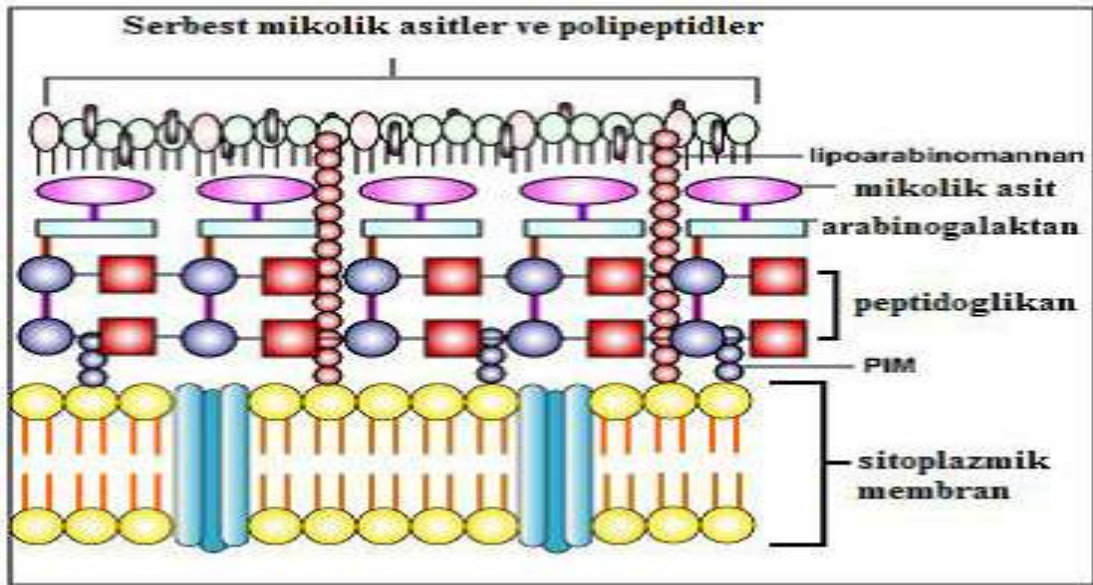
M.chelonae; bu bakteriler pleomorfik olup, küçük kok şeklinden, uzun çomak şekillerine kadar farklı biçimler gösterirler. Genç ve üremekte olan bakteriler asidorezistan olarak boyanabilirse de yaşlanmış kültürlerde bu özellikleri yok olabilir.Yumurtalı ve agarlı besiyerlerinde yedi günden önce koloniler oluşur. S şeklinde, yarım küre biçiminde ve pigmentsizdirler. Akciğer enfeksiyonları ve soğuk abseler oluşturdıkları bilinmektedir²¹.

2.2. Mikobakterilerin Hücre ve Kimyasal Yapıları

Hücre yapıları temelde diğer bakteriler gibidir. Diğer bakterilerden önemli ayrımları hücre duvarının yapısı ile kimyasal yapılarıdır. Hücre duvarının ana iskeleti, peptidoglikan ve arabinogalakattan moleküllerinin fosfodiester bağlarıyla bağlanmasından oluşurlar. Duvar yapısında ayrıca, lipoarabinomannan ve fenolik glikolipidler yer alır. Arabinogalakattan ve glikolipid molekülleri arasında ise mikolik asitler yer alır. Mikolik asitler, uzun zincirli sature yağ asitleri olup, duvar yapısının önemli bir bölümünü oluştururlar. Hücre duvarının kalınlığından ve asitlere karşı dirençli oluşundan bu yapı

sorumludur. Mikolik asitler, şekerlerle bağlanarak kord faktör oluşturabilirler. Kord faktörü, mikobakteriler dışında nokardia ve korinebakterilerde de bulunmaktadır. En dış tabaka bir grup heterojen peptidoglikolipidler veya fenolikglukolipidlerden oluşur. Bunlar sıklıkla ağ şeklinde lifsel yapı gösterirler. Hücre duvarında bulunan ve hücre duvar ağırlığının % 60'ını oluşturan lipidlerin çoğu, uzun zincirli yağ asitlerinden kaynaklanan, tüberkülostearik asit, mycoserosic ve mikolik asitleri içerir^{21,35}. Hücre duvarının lipid yapısındaki zenginliği, daha kalın ve lipofilik özellik göstermesi ve kimyasal yapısı sayesinde bakterilerin kendine özgü bazı özelliklerinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bunlar; aside dayanıklılık, Gram ve diğer bakteriyolojik boyalarla boyanmama ve hücrelerin bir araya toplanma özelliği, konak hücre hücre tarafından salınan litik enzimlere ve bakterisidal ilaçlara direnç ve muhtemelen bazı besinlerin, hatta antibiyotiklerin hücre içine girişinin engellenmesi şeklinde özetlenebilir³⁵.

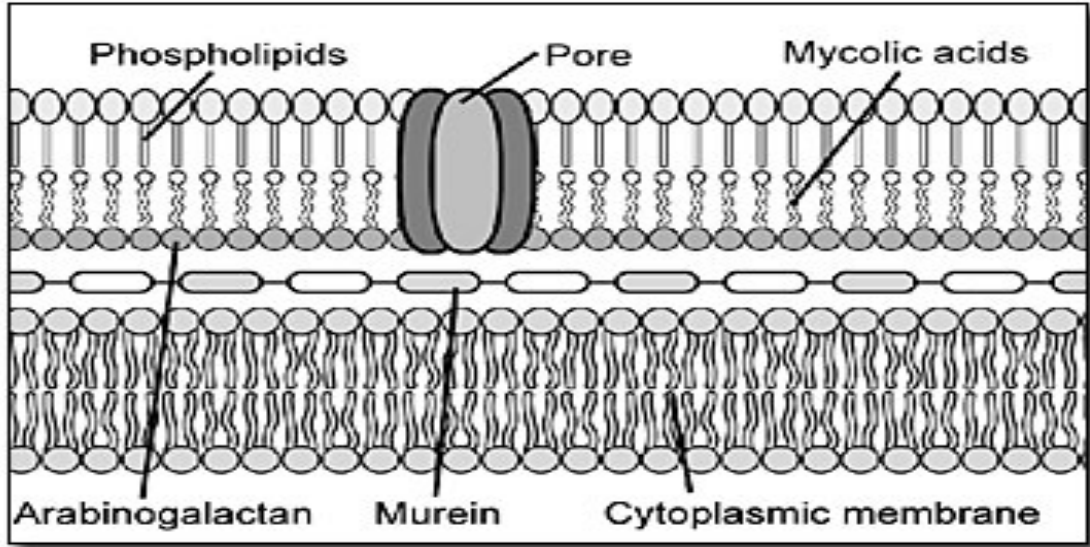
Şekil 1.'de Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1 Mikobakterilerin hücre duvar yapısı³⁶

Hücre duvarının en dışında bakteriye şeklini veren, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandıran peptidoglikan tabaka vardır. Bu yapı içerisinde alfa-1,4 glukoz, bir arabinomannan, lipomannan ve lipoarabinomannan gibi polisakkaritler son derece önem arz eder. Mikobakterilerin hücre duvarında Gram negatif bakterilerde görülen porin proteinleri de bulunur. Porinlerle birlikte transport proteinleri serpilmişlerdir. Proteinler biyolojik önemi olan antijenler olup enfeksiyonlara karşı hücresel bağışıklık yanıtı

uyarırlar^{38,39,40}. Hücre duvar tabakasına Mikobakteri porin yapısı Şekil 2 de gösterilmiştir.



Şekil 2 Mikobakteri porin yapısı³⁷

2.2.1. Mikobakteriyel Antijenler

Mikobakterilerin, fiziksel kimyasal ve fonksiyonel özelliklerine göre farklılıklar gösteren çok sayıda antijenleri bulunmaktadır. Mikobakteriyel antijenler, pek çok lipid, protein ve polisakkaritten oluşur. Antijenlerin sayısı yaklaşık 90 adettir. Mikobakteriyel antijenler, sitoplazmada (solubl) ve hücre duvarında lipitlere bağlı (insolubl) olarak bulunurlar^{40,41}.

Mikobakteriyel antijenlerin bazıları immun sistemi baskılayıcı işlev görürken, diğerleri granülom oluşumuna yol açma, makrofajları aktif etme, konakçı toksisitesi oluşturma ve adjuvan aktivite gösterme gibi işlevlerde bulunurlar^{41,42}.

Son yıllarda, immunolojik tanımayı sağlayan hücrelerle, mikobakteriyel genlerin klonlanması gibi tekniklerin geliştirilmesi antijenlerin saflaştırılması çalışmalarına büyük katkı sağlamış ve mikobakterilerin antijen ve antikorların ayrımı daha kolaylaşmıştır^{40,41}.

2.2.2 Mikobakteriyel proteinler

Antijenik özellik gösteren protein ve peptidler, hücre duvarı ve sitoplazmada bulunurlar. Hücre kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluştururlar. Proteinler tüberkülin tipi aşırı duyarlılık tepkimelerinden sorumludurlar. Balmumları, adjuvan özellikleri ile bu etkiyi arttırlar. Peptidler ise, hapten gibi davranabilir ve geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonu ortaya çıkarabilirler. Ribozomal proteinler de benzer etkiyi oluşturabilirler. Bazı peptit ürünlerinin antijenik özellik gösteren parçaları, polisakkarit, protein/peptid bileşiklerinin içinde bulunurlar³⁻²¹. Old tüberkülin (OT), tüberkülin testinde kullanılan temel maddedir^{21,41}. Pürfiye protein deriveleri (PPD), OT'un pürfikasyonu ile elde edilir. WHO tarafından tüberkülin deri testinde kullanımı kabul edilen test maddesidir^{21,41}. Antijen 5, antijen 6, antijen 60 ise pürfiye sitoplazmik proteinlerdir. Bakteriye karşı oluşan humoral immun cevabı göstermek amacıyla kullanımları umut vaat etmektedir. PPD'den daha özgündürler. Antijen 85 kompleksi salgısal bir proteindir. Enfeksiyon sonrası immun yanıtta rolü olduğu düşünülmektedir. 65 kDa proteini bir ısı proteinidir. Değişik mikobakteri türlerinde gösterilmiştir^{21,41}.

2.2.3. Mikobakteriyel Polisakkaritler

Mikobakterilerin önemli antijenik kısımlarını oluştururlar. Arabinoz, galaktoz ve mannoz içeren polisakkarit I molekülüleri geç tip aşırı duyarlılık oluşturabilirler. Polisakkarit II molekülüleri ise, geç tip aşırı duyarlılık oluşturmazlar, fakat serolojik aktivite gösterirler. Polisakkaritlerin temel kaynağı hücre duvarıdır. Nitekim, arabinogalaktanlar, arabinomannanlar ve glukonlar mikobakteri hücre duvarında bulunur³⁵.

2.2.4. Mikobakteriyel lipidler

Sitoplazmada bulunmalarına karşın, esas olarak hücre duvarında yer alırlar. Mikolik asitler, fosfolipidler, Wax D, mikrosidler ve diğer glikolipidlerin tümü hücre duvarında bulunurlar. Mikobakteriyel lipidlerin mikobakteriyel enfeksiyonlardaki rolü, konakçı toksisitesi oluşturmak ya da immunolojik aktivite ile olabilir^{21,35}.

2.2.4.1. Trehaloz glikolipidler (Cord faktör)

Cord faktörü, ip faktörü olup, bir trehalozo dimikolattır. Cord faktör, bakterinin virulansı ile ilgilidir. Toksik etkilidir ve granülom oluşmasına yol açar. Bu etkinin

makrofaj kemotaksisi ve uyarısına sekonder geliştiğine inanılmaktadır. Kord faktör, komplemanı alternatif yoldan aktive ederek, akut inflamasyona da yol açarlar^{21,41}.

2.2.4.2. Sülfatidler

Bakterilerin patojenliği ile ilgilidirler. Kord faktörle sinerjik etki yapar. Virulansda rolü vardır. Ayrıca fagosite edildikleri makrofajlarda fagolizozom oluşumunu engelleyerek bakterilerin çoğalma yeteneklerinin sürdürülmesini sağlarlar⁴¹.

2.2.4.3. Fosfatidil inositol monomannozydler (PIM) ve oligomannosidler

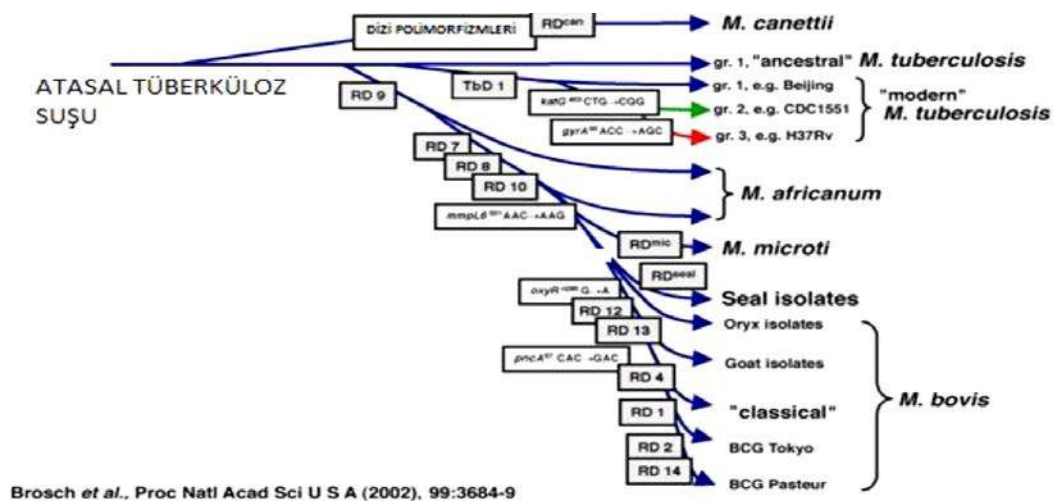
Hücre duvar iskeleti için bir çimento işlevi görürler. Saflaştırılmış PIM, hapten ve antikor yanıtı oluşturur. Bu özellikleri ile serolojik tanıda kullanılabilirler. PIM gibi hücre zarında bulunan bir fosfolipid olan kardiolipin de, serolojik tanıda kullanılabilir⁴¹.

2.2.4.4. Wax D ve muramildipeptid

Hücre duvarında bulunan peptidoglikolipittir. Adjuvant etki gösterirler. (Freund adjuvanı). Basile ait bazı proteinlerle birlikte tüberküline karşı geç tipte hipersensivite reaksiyonu oluşturur^{21,35,41}.

2.3. Mikobacterium tuberculosis complex türlerinin filogenetik bağları

Mikobakterilerin tür dağılımları genomlarında yer alan 20 farklı değişken bölgedeki insersiyon ve delesyonlar ile oluşmaktadır. İnsersiyon ve delesyonları dikkate alarak yapılan çalışmalarda filogenetik ilişkileri belirlenen yaklaşık 130 farklı mikobakteri türü olduğu tespit edilmiştir. Genetik benzerlikleri temel alınarak bu türler kompleks başlığı altında toplanmaktadır^{40,43,44}.



Şekil 3. M. tuberculosis kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki⁴³.

M. tuberculosis kompleks türleri içinde bazı değişken gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar, bu türleri birbirinden ayırmaktadır⁴⁵. *M. Tuberculosis* kompleksi içerisinde yer alan *M. canetti*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* ve *M. bovis* türlerine ait gen kırılmaları incelendiğinde; *M. tuberculosis* kompleksinde meydana gelen ilk değişimin 26 farklı gen bölgesindeki delesyon nedeni ile *M.canettii*'de olduğu gözlenmiştir⁴⁶.

M.tuberculosis RD gen bölgelerini ve RD9 bölgesini koruyarak *M. africanum*, *M. microti* ve *M. bovis* türlerinden; *M. africanum* RD9 bölgesini kaybederek *M.microti* ve *M. bovis* türlerinden; *M. microti* RD9, RD7, RD8 ve RD10 bölgelerini kaybedip, RD12, RD13, RD14, RD4, RD2 ve RD1 gen bölgelerini korumasıyla *M. bovis*'den ayrılmıştır. *M. bovis* RD12, RD13 ve RD4 bölgelerini kaybederek bazı türleri enfekte etme yeteneğini kaybetmiştir. *M. bovis*'in RD1, RD2 ve RD14 gen bölgelerini kaybetmesiyle atenüe BCG suşları ortaya çıkmıştır^{45,47}. *M.tuberculosis*'in RvD1 bölgesinin kaybıyla H37Rv, TbD1'deki ve IS6110 gibi bazı polimorfik gen bölgelerinde meydana gelen nokta mutasyonları sonucunda "Beijing", "Haarlem", ve "African" diye adlandırılan modern *M. tuberculosis* kökenleri ortaya çıkarmıştır^{40,43,45}.

2.4.Mikobakteriumların Genetik Yapısı

Gen analizi çalışmaları sonucunda mikobakterilerin genomunun birkaç tür dışında *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* (*E.coli*) gibi daha kolay ve hızlı üreyen bakterilere göre daha küçük olduğu belirlenmiştir. Mikobakterilerde genomun büyük kısmı (%59) replikasyonla ilgilidir. Kalan bölgenin %30'u lipid ve poliketid sentetaz ile ilgili, %10'u ise prolin glutamat (PG) ve prolin-prolin-glutamat (PPG) olarak tamamlanan iki akraba gen ailesine aittir. PG ve PPG genlerinin kodladığı proteinler hücre duvarı sentezinde rol oynamaktadır ve antijenik özelliğe sahiptirler. Mikobakterilerin genomunda ayrıca kodlama yapmayan diziler (13E12 ailesi), insersiyon dizileri ve mikobakteri tekrarlayan ünitelerini (MIRU) kodlayan gen bölgeleri de bulunmaktadır. Mikobakterilerde lipid mekanizması ile ilişkili genlerin çok olması, metabolizmalarında karbon kaynağı olarak lipidleri kullandıklarını göstermektedir^{48,49,50}.

Mikobakteriler 4.411.529 baz çifti büyüklüğünde ve diğer prokaryotlarda olduğu gibi halkasal bir genoma sahiptirler. Mikobakteri DNA'smda G+C oranının diğer bakterilerden yüksek olması, farklı bir gen ailesine ait kabul edilmelerinin

nedenlerindendir⁴⁹. Bununla birlikte enerji üretimi ve dönüşümünü sağlayan yapıların çoğu *E.coli* ve *Pseudomonas*'lar gibi Gram negatif bakterilerle yüksek oranda homolog olması Gram negatif bakterilere yakın olarak değerlendirilmelerine neden olmaktadır⁵⁰.

Pek çok bakteri türü fazla sayıda rRNA genlerine sahipken (örneğin *E.coli*'de yedi, *Streptococcus lividans*'ta sekiz tane), mikobakterilerde bu genler az sayıdadır. Yavaş üreyen türlerde 16S rRNA, 23S rRNA ve SS rRNA genlerinden sadece birer kopya bulunduğu gösterilmiştir. Buna karşılık *M.chelonae* ve *M.abscessus* dışındaki hızlı üreyen türlerde ise bu genlerden ikişer kopya bulunmaktadır^{1,51}.

Mikobakterilerde transpozonların varlığı da gösterilmiştir. Transpozonlar antibiyotik direncinden ya da virulanstan sorumlu olabilmektedir⁵¹.

2.5.Mikobakteri İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Mikobakteriler zorunlu aeroptur. Çoğu tür basit maddeleri kullanarak çoğalabilmektedir. Örneğin amonyak, asparajin, amonyum tuzları ve amino asitleri azot kaynağı; gliserol, glikoz ve sitratları ise karbon kaynağı olarak kullanabilirler. *M.genavense* ve *M.haemophilum* gibi birkaç tür ise müşkülpesenttir ve üremek için mikobaktin, hemin yada başka demir bileşenlerine ihtiyaç duymaktadır. *M.leprae* sadece canlı hücre içerisinde üreyebilmektedir. Mikobakteriler karbondioksit ya da yağ asitleri varlığında daha iyi çoğalmaktadırlar. Yağ asitleri yumurta sarısı veya oleik asit ile elde edilebilmektedir. Bununla birlikte oleik asit yüksek konsantrasyonlarda toksiktir (>%1) ve albümin ile notralize edilmelidir. Optimum üreme ısısı türlere göre 30°C ile 45°C arasında değişiklik göstermektedir. Çoğu tür 35-37°C arasında iyi üremektedir. Ortamda %5-10 oramnda CO₂ bulunması özellikle primer izolasyonda mikobakterilerin üremesini olumlu yönde etkilemektedir^{16,19,21,24,25,29,60}.

Konvansiyel olarak mikobakteri izolasyonu amacıyla kullanılan besiyerleri özelliklerine göre sıvı ve katı besiyerleri olarak ayrılabilir.

2.5.1. Sıvı Besiyerleri

Sıvı besiyerleri mikobakterilerin hem primer kültürlerindede hem de subkültürlerinde kullanılmaktadırlar. Sıvı besiyerlerinde mikobakteriler daha çabuk

üremektedir ve izolasyon oranları daha yüksektir. Sıvı besiyerleri olan MB 7H9 ve Dubos Tween albumin besiyeri; mikobakteri suşlarını stok kültürlerden üretme, ilaç duyarlılık testleri ve diğer in vitro testler için taze mikroorganizma hazırlamada kullanılmaktadır. Sıvı besiyerlerine Tween 80 eklenerek mikobakterilerin kümeleşmeden, homojen bir şekilde üremesi sağlanmaktadır^{19,25}.

Günümüzde birçok laboratuarda, konvansiyonel besiyerlerinin yanı sıra tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri rutin inceleme amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımını florometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür. Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak katı besiyeri kullanılması CDC tarafından önerilmiştir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir. Hızlı kültür sistemleri içinde yer alan yarı otomatize BACTEC 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır^{25,53,54}.

Sistemde izolasyonun yanı sıra, *M. tuberculosis* kompleksi ile tüberküloz dışı mikobakterilerin ayrımı yapılabilmekte ve *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı çalışılmaktadır. BACTEC 12B (Middlebrook 7H12) ve BACTEC 13A (Middlebrook 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem, besiyerlerinde bulunan 14C işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan işaretli olan C atomunun ölçülmesi ve ölçülme sonucu 0-999 arasında sayısal değerleri üreme indeksi (GI) olarak kullanması prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik ve antifungal karışımı ilave edilmektedir. Başarı ile kullanılmakla beraber, sistemde yer alan besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve cihazda yapılan rutin kontroller sırasında meydana gelen çapraz kontaminasyon sorun oluşturmaktadır. Günümüzde alternatif izolasyon sistemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir^{54,55}. Bunun dışında başka tam otomatize sistemler:

- ESP II (Extra Sensing Power) (Trek Diagnostics, Inc. ,Westlake, Ohio)
- MB/Bact T (Organon Teknika, Durham, NC)
- BACTEC 9000 MB (BD Biosciences, Sparks, MD)

•BACTEC MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube) (BD Biosciences, Sparks,MD) ^{25,54,55}

Sistemler arasında izolasyon oranı açısından önemli bir fark olmamakla birlikte, konvansiyonel katı besiyerlerine göre daha yüksek; BACTEC 460 TB sistemine göre daha düşük oranda izolasyon sağladıkları bildirilmektedir^{37,38,40}. Mikobakterileri üretme süreleri açısından sistemler karşılaştırıldığında, BACTEC 460 TB sisteminin, ESP II ve MB/BacT sistemlerine oranla daha avantajlı olduğu belirlenmiştir. Birçok çalışmada tam otomatize sistemlerde üretme süresi ortalama ≤ 14 gün olarak saptanmış ve en yüksek izolasyon oranının BACTEC 460 TB ve katı besiyeri kombinasyonu ile sağlandığı bildirilmiştir. Kontaminasyon oranları açısından tam otomatize sistemler birbiri ile karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunamamıştır ancak bu sistemlerde oran, BACTEC 460 TB ve katı besiyerlerine göre daha yüksektir^{54,55}.

ESP II sistemi, selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır. Bilgisayar destekli bir sistemdir ve besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak bilgisayar ekranında görüntülenir. Besiyerlerine ekim yapılmadan önce, mikobakterilerin üremesini destekleyen oleik asit-albumin dekstroza katalaz (OADC) ve kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karışımı ilave edilir. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur^{54,55}.

MB/Bac T, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensör içeren ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar desteği bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol altındadır. Steril örnekler ekilmeden önce besiyerlerine “reconstitution” sıvısı ilave edilirken; steril olmayan örneklerin ekiminden önce antibiyotik karışımı eklemek gereklidir. Sistem kan dışındaki tüm örnekler için uygundur⁵⁴.

BACTEC 9000 MB sistemi, besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiği bir sistemdir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için “Myco/F sputa”, kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için “MycoF/lytic” besiyeri kullanılır⁵⁴.

BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur.

Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC ve PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresan oluşmazken; mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı floresan oluşmakta ve oluşan floresan miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Tam otomatize bir sistem olmakla birlikte, UV ışığı altında makroskopik olarak da değerlendirme yapılabildiğinden manuel olarak kullanılmaya da uygundur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir^{54,55}.

Septi-Check AFB sistemi, sıvı (Middlebrook 7H9) ve üç tip katı (LJ, Middlebrook 7H11, çukulatamsı agar) besiyerinin kullanıldığı bifazik bir kültür sistemidir. Çukulatamsı agar kontaminasyonu belirlemek amacıyla kullanılır. Kültür işleminden önce besiyerine glukoz, gliserin, oleik asit, pridoksal HCl, katalaz, albumin, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim, polimiksin B ve amfoterisin B içeren zenginleştiriciler ve antibiyotik ve antifungaller ilave edilir. Klinik örneklerin ekiminden sonra besiyerleri ilk 24 saat ters olarak bekletilir ve süre sonunda dik konuma getirilir. Kültür süresince besiyerleri ara sıra hafifçe çalkalanarak sıvı besiyerinin katı besiyerlerine teması sağlanmalıdır. Sistem kan dışındaki tüm klinik örnekler için uygundur⁵⁴.

2.5.2. Katı Besiyerleri

Yumurta bazlı ve agar bazlı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılabilir.

2.5.2.1. Yumurta Bazlı Besiyerleri

Yumurta temelli besiyerleri; tam yumurta ya da yumurta sarısı, patates unu, tuz, gliserol bulundurmakta ve kaogülasyonla katılaştırılmaktadır. Ayrıca diğer bakterilerin üremesini engellemek amacıyla malaşit yeşili ilave edilmektedir. Löwenstein-Jensen (LJ), Petragnani, American Trudeau Society ve Ogawa besiyerleri yumurta temelli besiyerleridir. Bu besiyerleri çoğu mikobakteri türlerinin iyi üremesini sağlamaktadır^{25,58}.

Yumurta temelli besiyerleri arasında en fazla kullanılan LJ besiyeridir. Bu besiyeri diğer mikobakteri türlerinin izolasyonunda, *M tuberculosis*'in izolasyonunda olduğu kadar güvenilir değildir, Petragnani besiyerinde, LJ besiyerindeki malaşit yeşili konsantrasyonunun iki kati bulunmaktadır ve özellikle yoğun olarak kontamine örneklerden mikobakterilerin izole edilmesinde kullanılmaktadır. American Trudeau

Society besiyerindeki malaşit yeşili konsantrasyonu, LJ besiyerindekinden daha düşük olduğundan daha kolay kontamine olabilmektedir. Ancak mikobakterilerin üremesi daha az inhibe olmakta ve böylece daha kısa sürede daha büyük koloniler oluşturabilmektedir¹⁷⁻²⁵.

2.5.2.2 .Agar Bazlı Besiyerleri

Agar temelli besiyerleri, yumurta temelli olanlara göre kimyasal olarak daha iyi tanımlanmıştır. Bu besiyerleri şeffaf görünümde olmaları sayesinde kolonilerin erken dönemde mikroskopik olarak görülmesine olanak sağlamaktadır. Bu besiyerlerinde koloniler 10-12 günde gözlenebilirken, yumurta temelli besiyerlerinde bu süre 18-24 gün aralığındadır. Agar temelli besiyerleri duyarlılık deneylerinde de kullanılabilir¹⁷⁻²⁵.

2.5.2.3. Selektif Besiyerleri

Antimikrobiyal maddelerin ilave edilmesiyle, kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesi engellenebilmektedir. Ancak belirli bir örnek için selektif besiyerleri tek başına değil, selektif olmayan agar ya da yumurta temelli besiyeri ile birlikte kullanılmalıdır. Yumurta temelli selektif besiyerleri arasında penisilin ve nalidiksik asit içeren LJ Gruft; sikloheksimid, linkomisin ve nalidiksik asit içeren Mycobactosel LJ besiyeri bulunmaktadır. Sikloheksimid, linkomisin ve nalidiksik asit içeren selektif MB 7H10S, Mitchison selektif 7H11 (7H11S) besiyeri ve onun karbenisilin (özellikle Pseudomonas'ları inhibe etmekte yararlı olmaktadır), polimiksin B, trimetoprim laktat ve amfoterisin B içeren modifikasyonları da kullanılan selektif besiyerlerindendir^{21,25}.

2.5.3. Bifazik Besiyerleri

Mikobakteri kültürü için kullanılan Septi-Chek AFB Sistemi (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD); sıvı besiyeri olarak modifiye 7H9, kati besiyeri olarak modifiye LJ, MB 7H11 agar ve çikolatamsi agar içeren bifazik bir sistemdir. Çikolatamsi agar ile bakteriyel kontaminasyon tespit edilebilmektedir. İnokülasyon öncesinde besiyerine glukoz, gliserol, oleik asit, piridoksal HCl, katalaz, albumin ve antibiyotikler (PANTA: Polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve

azlosilin) içeren bir suplement eklenmektedir. Bu sistemin duyarlılığı BACTEC 460TB (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) sistemine yakındır. Üremenin saptanması için gereken süre BACTEC 460TB sisteminden uzun, klasik kültür yöntemlerinden kısadır^{25,60}.

2.6. Mikobakterilerin Çevre Koşullarına Dayanıklılıkları

Fiziksel, kimyasal ve çere koşullarına dayanıklılıkları, epidemiyolojik ve klinik bakımdan önemlidir. Mikobakteriler kurumaya karşı çok fazla dirençlidirler. 37°C'deki besiyerinde 12 yıl canlı ve virulan kaldıkları gösterilmiştir. Dirençte bakterinin bulunduğu ortam koşullarının önemi çok fazladır. Örneğin kuru balgamda güneş ışığı olmadığı durumda 6-8 ay canlı kalabilmektedirler. Dezenfektanlara diğer bakterilere oranla daha fazla direnç gösterirler. Hidrofobisitenin hücre duvarının yüksek lipid oranına bağlı olduğu düşünülmektedir⁵⁷.

NTM'lerin su sistemlerinde yaygın olarak kolonize olmalarının nedeni, klora ve biyosidlere dirençli olmalarıdır. Hatta su sistemlerinin dezenfeksiyonunda en sık kullanılan klor başta olmak üzere, sodyum hipoklorid, kloramin, klor dioksit ve ozon gibi maddeler, NTM'lerin seçilimine neden olmaktadır⁴⁻⁵⁶.

Sodyum hipoklorit, %70 lik alkol, %5 fenol povidon-iyodin mikroorganizmalar üzerine etkin olan dezenfektanlardan bazılarıdır. Ancak mikroorganizmaların organik maddelerin içinde olmaları dezenfektanların etkisini azaltmaktadır⁵⁷.

Madeni asit ve alkali maddelerin %3-10 oranındaki eriyiklerinin ve dördü amonyum bileşiklerinin bu bakterilere olan etkileri azdır. Bu maddeler balgam gibi kontamine materyeldeki diğer bakterileri öldürmek ve *Mycobacterium*'ların saf kültürlerinin elde etmede önemi bulunmaktadır. Yalnız organik asitler ve doymamış yağ asitleri bu bakterilere toksik etki yapabilmektedir⁵⁷.

Mycobacterium'lar malaşit yeşili gibi boyalara karşı diğer bakterilere oranla daha fazla dirençlidirler. Bu nedenle, bu boyalar karışık kontamine ortamdan mikobakterilerin izole edilmesinde kullanılan besiyerine eklenerek, ayırt edici özellikte besiyeri (LJ) elde edilir. Mikobakteriler, ultraviyole ışınları, basınçlı buharla sterilizasyon ve pastörizasyona karşı duyarlıdır. 60°C'da 15-20 dakikada ölürler. Balgam, kirli çamaşır ve kaplardaki basiller beş dakika kaynatmakla öldürülebilirler. Sütteki mikobakteriler

öldürmek için pastörizasyon yeterlidir. Doğrudan etki eden güneş ışığı ve ultraviyole ışınları bakterinin ölümünde etkilir⁵⁷.

Su sistemleri için önerilen serbest klor miktarı Türk Standartları Enstitüsü'ne göre 0.5 mg/l aralığında olması gerekmektedir olup, NTM'lerin dezenfeksiyonu için bu miktar yeterli olmamaktadır. Suyun dezenfeksiyonunda geleneksel kimyasal yöntemlere bir alternatif de ultraviyole (UV) ışınlarıdır. Ancak *M.avium*'un UV ile dezenfeksiyona da oldukça dirençli olduğu; 1-log10 *E.coli*'yi inaktive etmek için yaklaşık 1,5 mJ/cm² UV dozu gerekirken, aynı sayıda *M.avium*'u inaktive etmek için yaklaşık 6 mJ/cm² UV ışınmasına ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir⁵⁸. Yine mikobakterilerin UV duyarlılığının türlere göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Mikobakterilerin UV'ye *E. coli*'ye göre 2-10 kat daha dirençli olduğu; ayrıca 3 log *M.avium*, *M.intracellulare* ya da *M.lentiflavum* 20 mJ/cm² UV ışını ile inaktive edilirken, aynı miktarda *M.fortuitum*'un inaktivasyonu için 50 ml/cm²'den fazla UV dozu gerektiği gösterilmiştir⁵⁹.

Doğrudan güneş ışığı kültür bakterilerinin iki saatte, balgamdaki basilleri ise ancak 20-30 saatte öldürebilmektedir. Karanlıkta bırakılan yumurtalı besiyerlerindeki kültürlerde uzun süre canlı kalabilmektedirler⁵⁷.

Mikobakterilere etkili çeşitli kemoterapik maddeler bulunmaktadır. Sağaltımda kullanılan bu kemoterapiklerden başlıcaları izoniazid (INH), streptomisin, para aminosalisik asit (PAS), ethambutol ve rifampisin olup *M.tuberculosis* ve *M.bovis* kökenleri değişik oranlarda bu maddelere karşı direnç kazanmışlardır⁵⁷.

2.7. Mikobakterilerin Sularda Bulunmasını Etkileyen Başlıca Özellikler

NTM'ler nehir, göl, bataklık, deniz gibi doğal sularda olduğu gibi, ev ve hastanelerdeki su sistemlerinde de yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardır. Bu mikobakterilerin doğal yaşam ortamları aslında su değil, nemli topraklardır ve buradan sulara karışmaktadırlar. Sahip oldukları bazı özellikler sayesinde suda yaşamlarını sürdürmekte, çoğalmakta ve kolonize olmaktadır⁴.

İnsanlar su vasıtasıyla nontuberküloz mikobakterilerle sürekli temas halindedirler. Tam anlamıyla eradikasyon mümkün olmasa da özellikle hastanelerde bakteriyel filtre

kullanımı, dezenfeksiyon konsantrasyonu ve süresi, su depolarının düzenli temizliği gibi tedbirlerle mikobakteri yoğunluğu azaltılabilir⁶⁶.

Su sistemlerinde mikobakterilerin üreyebilmesi için bazı faktörler şunlardır. Boruları kaplayan maddelerin bileşim, gözenek, sertlik ve kimyasal yapı gibi özellikleri, su basıncı, çevresel etkiler (bulanıklık, pH, ısı), sistemin özellikleri (boru çapları durağan ölü nokta varlığı), sistemde bulunan dezenfektan miktarları, mikrobik etkileşimler, suda bulunan ve çözülebilen organik maddelerin miktarı⁴.

Su sistemleri, düşük düzeydeki çözünen organik karbon oranı nedeniyle besin maddesi açısından fakir bir ortamdır. Buna karşın mikobakteriler eser düzeyde organik madde varlığında bile canlılıklarını koruyabilmektedirler. Ayrıca ölen bakteriler, paslanma ve çürüme nedeniyle boruların aşınması, tortulaşması ve suya karışan organik maddeler sayesinde sudaki besin miktarında artış gerçekleşebilmektedir⁴.

Sudaki demir oranlarıyla mikobakteri sayısı arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bu durum, karmaşık bir ilişki sonucudur. Boruların paslanması nedeniyle açığa çıkan yüksek miktarda demir, serbest klorla reaksiyona girmekte ve klor miktarını azaltmaya neden olmaktadır⁷. Bu nedenden dolayı genellikle su sistemlerinde PVC (polivinil klorid) borularının kullanılması önerilir⁵.

Mikobakteriler pH ve ısı direnci, spor oluşturmeyen bakteriler arasında ilk sırada yer almaktadırlar. Diğer patojen bakterilere göre daha geniş pH ve ısı aralığına tolerans göstermektedirler. MAC, *M.xenopi*, *M.phlei* ve *M.chlenoae* en fazla termoresistan özellik gösteren NTM türleridir¹⁰.

Klor ve dezenfektan direncinde ise, NTM'ler klor ve dezenfektanlara diğer bakterilere göre daha dirençlidir. Pek çok NTM türü su sistemlerinde bulunan düşük konsantrasyondaki kloru (0,1- 0,5 mg/l serbest klor) tolere edebilmektedir. Bu nedenle sulardaki klor ve dezenfektan muamelesi NTM'lerin seçilimine neden olabilmektedir. *M.avium'un E.coli'ye* göre klora 500 kat daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Yine NTM'ler cerrahi aletlerin sterilizasyonunda kullanılan formaldehid ve alkali gluteraldehide ve ayrıca ticari olarak bulunan dezenfektanlara karşı diğer bakterilerden daha dirençlidirler^{6,7,61}.

NTM' ler çok düşük düzeylerde organik madde ve düşük düzeyde oksijen içeren sularda üreyebilmekte yaşamını sürdürebilmektedirler^{8,9}.

Mikobakteriler su sistemlerinde biyofilm oluřturmakta, böylece suyun akıř sűratinden korunarak, sistemlerde kolonize olup çoęalmakta, ayrıca antimikrobiyallerin etkisinden daha iyi korunmaktadır. Mikobakterilerin biyofilm oluřturma mekanizması tam olarak açıęa kavuřmamıřtır. Bu bakteriler flagella, pili, fimbriya, slime tabakası ya da kapsűl gibi yapılardan yoksundurlar. Mikobakterilerin bir tűr kayma ve yapıřma mekanizmasıyla yűzeyle tutundukları, hűcre duvarlarındaki uzun zincirli yaę asitleri ve glikopeptidolipidlerle yűzey arasında hidrofobik etkileřimler sayesinde biyofilm oluřturdukları dűřűnűlmektedir⁴.

NTM'ler su sistemlerinde de bulunabilen bazı protozoonlarla (*Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Dictyostelium discoideum* ve *Tetrahymena pyriformis*) parazitik ve simbiyotik iliřkiler sűrdűrebilmektedir. Bu protozoonlar NTM'ler için hem rezervuar, hem de su sistemlerine yer deęiřtirmelerinde araç görevi gűrebilmektedir⁶².

2.8. NTM İnfeksiyonu ve Patogenez

NTM'ler insandan insana bulaşmamakta, çevredeki kaynaklardan insanlara bulaşmaktadır. İnsanlar kontamine su ile temas ettiklerinde, yiyecekler ve içecekler aracılığıyla gastrointestinal yoldan veya duř alırken ya da temizlik yaparken aerosollerin inhalasyon yolu ile NTM'lere maruz kalınabilmektedir. Sularda bulunan NTM'ler, vűcudaya giriş yoluna ve konağın bağışıklık gűre hastalık oluşturmadan kolonize olabilmekte veya pulmoner infeksiyon, deri ve yumuşak doku infeksiyonu ve diseminat infeksiyon gelişebilmektedir. NTM infeksiyonları genellikle MTBC'nin neden olduğu infeksiyonlarla karıřtırılabilmektedir⁴.

NTM'lerin neden olduęu infeksiyonların patogenezi henűz tam olarak anlařılamamıřtır. Gűnűműzde sularda bulunan NTM'lerin ne derecede risk oluřturduęuna dair çok az bilgi bulunmaktadır. NTM tűrlerinin infeksiyoz dozu, sulardaki daęılımları, miktarları ve virulans faktörleri ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır ve infeksiyon için model organizma ya da uygun bir matematiksel model de mevcut deęildir. NTM'lerin infeksiyoz dozu ile ilgili çalıřmalar azdır ve özellikle MAC (*Mikobakterium avium* kompleksi) ile bej farelerde yapılmıř deneyleri kapsamaktadır⁴.

İnsanlar, çevrede çok yaygın olarak bulunmaları nedeniyle NTM'lerle sıklıkla karşılaşabilmektedirler. AIDS'in yaygınlaştığı yıllara kadar bu mikroorganizmalar nadiren ciddi infeksiyonlara neden olmuşlardır. NTM'lerin çevrede çok yaygın bulunmaları ancak nadiren hastalığa neden olmaları, infeksiyonun gelişmesinde bakterinin virulansından ya da alınan bakteri miktarından çok konağın duyarlılığıyla ilgili faktörlerin belirleyici olduğunu düşündürmektedir. NTM infeksiyonları özellikle risk faktörü taşıyan ve altta yatan bir hastalığı bulunan kişilerde gelişmektedir. KOAH, pnömokonyoz, kistik fibrozis hastaları, kemoterapi gören kişiler, organ transplantasyonu yapılan hastalar, AIDS 'liler, yenidoğanlar, yoğun bakım hastaları, yaşlı kişiler, alkol ve sigara kullananlar ve bazı genetik bozukluklar nedeniyle NTM'lere fazla duyarlı kişiler risk altındadırlar. NTM infeksiyonlarına karşı artmış duyarlılıkla ilişkili en önemli genetik faktor, interferon (IFN)-y eksikliğidir. Bu eksikliğin olduğu kişiler olgun granüloma oluşmaz ve kişiler önemli oranda mikobakteri infeksiyonlarına duyarlıdırlar. İnterloklin (IL)-12 regülasyonunun sorunu olan kişilerde de tedaviye yanıt vermeyen disemine NTM infeksiyonları gelişebilmektedir. Son yıllarda bunlara eklenen iki yeni risk faktörü daha oluşmuş ve kistik fibroz transmembran iletim düzenleyicisi (CFTR) geni ya da alfa-1- antitripsin geninde mutasyon görülmesinin NTM'lerin neden olduğu akciğer infeksiyonu gelişmesine ilişlilidir^{1,4,29,63,64,65}.

Sağlıklı, immün sisteminde problem bulunmayan kişilerde NTM'ler hastalık oluşturmaktan ziyade, solunum yolunda ve gastrointestinal kanalda kolonizasyona neden olmaktadır. Bununla birlikte, NTM'lere tekrarlayıcı şekilde maruz kalmanın ardından sağlıklı insanlarda da infeksiyon gelişebilmektedir. Jakuzi ya da duş suyu kaynaklı olarak ortaya çıkan ve sıklıkla MAC'nın etken olduğu akciğer infeksiyonları bildirilmiştir. Sağlıklı kişilerde görülen bu infeksiyonlar genellikle tedaviye yanıt vermekte ve disseminasyon görülmemektedir.^{67,68,69,70}.

Organizmaya giren mikobakterile öncelikle makrofajlar tarafından tutulmaktadır. Mikobakteriler kompleks glikopeptidolipid yapıdaki hücre duvarları sayesinde fagolizozomal birleşmeye ve lizise uğramaktan kurtulmaktadır. İnfekte makrofajlar kemokinler, IL-12 gibi sitokin sinyalleri üreterek, doğal öldürücü (NK) hücreleri ile T ve B lenfositlerinin uyarılmasının ve toplanmasını sağlamaktadır. Böylece mikobakterilerin öldürülmesi için immün yanıtın hem doğal, hem de kazanılmış bağışıklıkta rol oynayan hücrelerini harekete geçirmektedirler. Lenfositler

de makrofajları aktive etmek için tümör nekrotize edici faktör alfa (TNF- α), INF- γ ve granülosit-makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF) salgılamaktadır. Antijenik ürünlerler ya da sindirilemeyen mikroorganizmalar, tip IV hücreleri ile bölgesel lenf düğümlerine ulaşmakta ve burada yardımcı T lenfositlerini (CD4) aktive etmektedir. Sitotoksik T lenfositleri (CD8) de makrofajların mikobakterileri öldürmesine yardımcı olmaktadır. İmmün yetmezliği olan kişilerde görülen disemine enfeksiyon genellikle kolonize olmuş NTM'lerle oluşmaktadır^{63,64}.

2.9. Yalancı Pozitiflik ve Kolonizasyon

Yalancı pozitiflik; enfeksiyon ya da kolonizasyon olmadan, herhangi bir aşamada (örnek toplama, taşıma, çalışma) kontaminasyon nedeniyle klinik örneğin pozitifliğidir. Hastaların örnek vermeden önce NTM'lerle kontamine suyla ağzını çalkalamasında, gargara yapmasında, bronkoskopların ve steril aletlerin yetersiz dezenfeksiyonunda, ya da dezenfeksiyon işlemi sonrasında kontamine musluk suyu ile çalkalanması, laboratuvarlarda kullanılan solüsyonların hazırlandığı distile suyun kontamine olması yalancı pozitifliğe neden olan durumlardandır⁴.

Kolonizasyon; NTM'lerin hastalık oluşturmada ve dokuya invaze olmadan mikroorganizmanın bulunmasıdır. Kolonizasyon durumunda NTM'lerin klinik örnekten bir defadan fazla izolasyonu söz konusudur. NTM'ler hem solunum sisteminde, hem de gastrointestinal sistemde kolonize olabilirler. KOAH'lı, pnömokonyozlu, bronşektazili ve kistik fibrozisli hastalar, solunum sisteminin NTM'lerle kolonizasyonu açısından daha fazla risk altındadır⁶. Bununla birlikte altta yatan bir hastalığı olmayan sağlıklı bireylerde de NTN'lerle kolonizasyon görülebilmektedir. Kolonizasyonun NTM'lerle kontamine sulardan kaynaklandığı moleküler yöntemler ile olgular halinde bildirilmiştir⁷¹.

2.10. Non-Tüberküloz Mikobakteri İdentifikasyonlarında Laboratuvar Tanısı

Mikobakterilerin üreme süresi ve pigment oluşturma özelliğine bakılarak hangi deneylerin kullanılacağı ve identifikasyon için nasıl bir yol izleneceğine karar verilmektedir. Geleneksel yöntemler iyi tanımlanmış, standardize edilmiş ve göreceli

olarak daha ucuz yöntemler olmakla birlikte genellikle yetersiz kalmakta ve uzun süre gerektirmektedir. NTM suşlarının konvansiyonel deneylerle tanımlanamamasının nedenleri arasında çok farklı türlerin benzer biyokimyasal profiller ve morfolojik özellikler göstermesi, ve son yıllarda 16S rRNA geni sekansına göre tanımlanmış yeni türlerden bazılarının fenotipik özelliklerinin henüz tam olarak bilinmemesi sayılabilir^{19,60,72}.

Tüberküloz tanısında ilk basamak, aside dirençli boyama yöntemlerinin uygulanmasıdır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basil görülmesinden sonra, klinik ve radyolojik bulgular da tüberküloz tanısını destekliyorsa, genellikle tüberküloz tedavisine hemen başlanmaktadır. Daha sonraki süreçte elde edilen kültür ve duyarlılık test sonuçları, verilen tedavinin daha etkin kılınmasını sağlamaktadır. NTM mikroskopik inceleme ile ayırte edilmesi mümkün olmadığından, NTM ile infekte hastalarda tedavi etkisiz kalabilmektedir⁷³.

NTM infeksiyonlarının laboratuvar tanısı, kültür yöntemleri ile mikobakteri izolasyonu sonrasında, ek yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir. Hasta örneğinden kültür yöntemleriyle mikobakteri izolasyonu sonrasında takip edilen yol öncelikle, *M. tuberculosis* kompleksi ile NTM türlerinin ayrımının yapılmasıdır. Bu aşama NTM tanısı ile sonuçlanırsa bundan sonraki basamak, elde edilmiş olan NTM türünün idantifikasyonudur. Bu nedenle NTM infeksiyonlarının laboratuvar tanısı genel olarak, mikobakterilerin tür düzeyinde idantifikasyonuna dayanmaktadır. NTM'lerin tür düzeyinde idantifikasyonu, bu suşlarla infekte hastalara gereksiz tedavinin verilmesini önlemekte, doğru tedavi yaklaşımları sayesinde ekonomik kayıplara engel olunabilmektedir⁷³.

Mikobakterilerin tür düzeyinde idantifikasyonu epidemiyolojik açıdan da büyük önem taşımaktadır. Bu sayede son yıllara kadar sadece “atipik mikobakteriyel infeksiyon” olarak tanımlanan infeksiyonların gerçek infeksiyöz etkenleri tür düzeyinde isimlendirilebilmektedir^{60,72,73}.

Mikroorganizmaların idantifikasyonu yapılırken hem fenotipik, hem de genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır. Mikobakterilerin idantifikasyonunda kaydedilen gelişmelere bakıldığında, 1980’li yıllara kadar fenotipik özelliklerin incelendiği testlerin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. 1980’lerden günümüze kadar olan süreçte ise

moleküler yöntemlerdeki ilerlemenin etkisiyle genotipik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır⁷³.

Genotipik özelliklerin araştırıldığı moleküler yöntemler, iki önemli kavram esas alınarak geliştirilmektedirler. Bunlardan birincisi, her mikroorganizmanın genomunda çok iyi korunmuş, sadece o mikroorganizmaya özgü dizilerin bulunması; ikincisi ise bu iyi korunmuş diziler içinde türden türe farklılık gösteren daha küçük dizilerin veya nükleotidlerin bulunmasıdır. Böylece tek bir nükleotidin delesyonu veya yer değiştirmesiyle oluşmuş farklı türler birbirlerinden ayırtedilebilmektedir. Mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle idantifikasyonunda en yaygın olarak seçilen hedef bölge, 16S rRNA'yı kodlayan genidir. Bu gen yaklaşık olarak 1500 nükleotidden oluşur. Her mikroorganizma için belirli bir gen dizisi bulunmakla birlikte, bu dizi içindeki 10-15 nükleotiddeki farklılık tür ayrımının yapılabilmesini sağlamaktadır. Ancak mikobakteri türleri diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında, genetik olarak birbirlerine çok daha yakındırlar. Bu nedenle değişik mikobakteri türleri arasındaki nükleotid farklılığı çok daha azdır. Mikobakteri türleri birbirleriyle karşılaştırıldığında, 16S rRNA geninde sadece birkaç nükleotidin farklı olduğu görülmektedir. Mikobakteriyel 16S rRNA gen dizileri içinde en fazla farklılık gösteren tür, 7 farklı nükleotid içeren *M. avium* kompleksidir⁷³.

AIDS olgularının artmasıyla birlikte, *M.tuberculosis* dışındaki mikobakterilerle oluşturulan infeksiyonlarda da belirgin artışlar görülmeye başlanmıştır. Normal şartlarda insan için patojen olmayan bazı mikobakteri türleri, immün sistemin zayıfladığı AIDS gibi durumlarda, hayatı tehdit edecek önemli infeksiyonlara neden olabilmektedirler.

Tüberküloz olgu sayısında görülen son yıllardaki artışın en önemli nedeni, başta *M.avium-intracellulare* olmak üzere, NTM türleri ile oluşturulan infeksiyonların çoğalmasındır^{27,73}.

2.10.1.NTM İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Biyokimyasal Testler

NTM enfeksiyonlarında, özgül klinik bulgular yoktur. Kesin tanının mikrobiyolojik inceleme sonucunda konması gereklidir. NTM türlerinin tanımlanması amacıyla kullanılan çeşitli klasik biyokimyasal yöntemler mevcuttur. Bu biyokimyasal yöntemlerde genel olarak, kültür yöntemleriyle bakteri üretildikten sonra, NTM türlerinin fenotipik özellikleri araştırılmaktadır. Ancak fenotipik özellikler sadece sınırlı sayıda türün birbirinden ayırtedilebilmesini sağlayabilmektedir⁷³.

Bunlardan katalaz testi, *M. tuberculosis*, *M.gastri* ve *M. kansasii*'yi diğer mikobakterilerden ayırtedebilmek amacıyla kullanılır. Tüm mikobakteriler katalaz deneyi ile olumlu sonuç verirken, bu üç mikobakteri türü katalaz testi ile olumsuz sonuç verirler⁷³.

Katalaz; hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijene parçalayabilen, çözünebilen, hücre içi bir enzimdir. Katalaz enzimi varlığı, kültürde üremiş mikroorganizma üzerine hidrojen peroksit eklenmesinden sonra hava kabarcığı oluşumunun gözlenmesidir^{16,27,58}.

Katalaz testi semikantitatif olarak da uygulanabilir. Bu durumda mikobakteriler kendi içlerinde düşük ve yüksek katalaz aktivitesine sahip olanlar şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Eğri olmayan, dik olarak hazırlanmış tüpteki (16x150 mm) bir LJ besiyerine süşün standart kültür süspansiyonundan 0,2 ml ekilir. Tüpler, kapakları gevşetilmiş olarak 35°C'de 2 hafta inkübe edilir. Ardından tüplere %10 Tween 80 ve %30 H_2O_2 'nin 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmış olan ayraçtan ilave edilerek oda ısısında beş dakika dik olarak bekletilir ve hava kabarcıklarının ne kadar yükselmiş olduğu milimetre cinsinden ölçülür. Hava kabarcıklarının yüksekliği 45 mm'den düşük ise süş düşük katalaz aktivitesine, yüksek ise yüksek katalaz aktivitesine sahiptir. *M.tuberculosis* H37Ra düşük, *M.kansasii* ise yüksek katalaz aktivitesine sahiptir ve kontrol olarak kullanılabilirler^{17,21,27}.

Nitrat redüksüyon testi; mikobakteri türleri nitratı nitrite dönüştürme yetenekleri açısından farklılıklar gösterebilmektedir. Mikobakterilerin bu özellikleri kültürün eskiliği, sıcaklık, pH ve enzim inhibitörleri gibi faktörlerden etkilenmektedir. Nitrat redüksiyonu ile koloni morfolojisi, üreme hızı ve pigment özellikleri birbirine benzeyen mikobakterilerin ayırımında yarar sağlamaktadır. HUM'ler (Hızlı Üreyen Mikobakteriler) için bu test iki haftalık kültürlerle uygulanabilirken, yavaş üreyen bakterilerde üç ile dört haftalık kültürlerde kullanılmalıdır^{17,27,74}. Bu test hem ticari olarak üretilmiş olan strip hemde kimyasal olarak kullanılmaktadır

Ticari olarak uygulanan strip testleriyle, ancak kuvvetli nitrat pozitif süşlarda kabul edilebilir sonuç elde edilmektedir. Buna örnek olarak, *M.tuberculosis*'tir. Strip testi uygulanması kimyasal yöntemle göre çok kolay olması nedeniyle tercih edilmektedir. Kontrol olarak *M.tuberculosis* kullanılmalıdır. Kontrol süşu kuvvetli pozitif olmadığında, ya da test edilen süşün negatif olduğu görüldüğünde, kimyasal yöntem ile test tekrar edilmelidir^{17,27}.

Mac Conkey agarda üreme testi, *M. fortuitum* ile *M. chelonae*'nin diğer mikobakterilerden ayrılmasını sağlar. Sadece bu iki mikobakteri türü Mac Conkey agarda üreme gösterirler⁷³.

Niasin testinde *M. tuberculosis*'in tanımlanmasını sağlar. *M. tuberculosis*'in üreme esnasında besiyeri ortamına saldıgı niasin, siyanojen bromür veya anilin eriyiğı gibi ayıraçlarla saptanarak *M. tuberculosis* varlığı doğrulanır. Diğer mikobakteriler niasin salgılamazlar⁷³.

Niasin (nikotinik asit) mikobakterilerin metabolizmasında oksidasyon- redüksiyon reaksiyonlarında ve DNA'nın onarımında önemli bir rol oynamaktadır. Niasin, koenzim NAD ve NADP'nin biyosentezinde öncü maddedir. Tüm mikobakteriler nikotinik asit üretmekle birlikte, bazılarında NAD süpürücü yol izlerinin engeline bağılı olarak niasin hücre dışına atılmaktadır. Besiyerinde biriken niasin, bir primer aminli siyanojen bileşiğı ile görünür hale getirilebilmektedir. Mikobakteriler arasında en fazla niasin birikimi *M. tuberculosis*'de görölmektedir. Bazı *M. simiae* ve *M. chelonae* suşlarında da niasin birikimi görölebilmektedir^{16,17,21,27}.

Günümüzde ticari olarak sağlanabilen niasin stripleri bulunmaktadır (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD). Bakterinin yoğun olarak üremiş olduğı LJ besiyerinin üzerine 1 (bir) ml distile su eklenir ve tüp 20 dakika kadar yatay bir durumda bekletilir. Sıvının 0,5 ml'si bir tüpe aktarılır. Niasin stripi tüp içerisine konularak ağızı kapatılır. Tüp içerisindeki sıvı 15 dakika oda ısısında bekletilmesinin ardından sarıya dönüşürse, testin sonucu pozitif kabul edilir. *M. tuberculosis* H37Ra pozitif, *M. avium* ise negatif kontrol olarak kullanılabilir^{17,27,74}.

Pirazinamidaz testi, bazı mikobakterilerin pirazinamidi pirazinoik aside parçalaması esasına dayanır. Bu test ile *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare* ve *M. marinum* pozitif sonuç verirken, *M. bovis* ile *M. kansasii* negatif sonuç verirler⁷³.

Pirazinamidaz enzimi, pirazinamidi (PZA) amonyak ve pirazinoik asite parçalar ve bu da ferroz amonyum sulfat eklenmesiyle belirlenebilir. Bu test *M. marinum*'u *M. kansasii*'den ayırmada yararlıdır^{58,74}.

Bu test için kullanılan besiyeri; 1 litrede 0,1g PZA, 0,2g piruvik asit ve 15 g agar içeren Dubos sıvı besiyeridir. Besiyeri 5 ml'lik hacimlere bölünür, otoklavlanır ve dik halde katılaşması için bekletilir. Besiyerine mikobakteri suşundan yoğun olarak ekim yapılır. Dört gün 37°C'de inkübe edildikten sonra 1ml %1 'lik ferroz amonyum sülfat

eklenir. Buzdolabında 4 saat bekletilirken tüp, agarda pembe bir bant oluşumu açısından gözlenir. Bu pembe bantın oluşumu, sonucun pozitif olduğunu gösterir. *M.avium* pozitif, ekim yapılmamış besiyeri ise negatif kontrol olarak kullanılabilir^{21,27}.

Thiophene-2 karboksilik asit hidrazid testi, *M. tuberculosis* ile *M. bovis*'i birbirinden ayırmak amacıyla kullanılır. *M. tuberculosis*, içinde thiophene-2 karboksilik asit hidrazid bulunan Middlebrook besiyerinde ürerken, *M. bovis* bu besiyerinde üremez⁷³.

İçerisinde 10 µg/ml T2H içeren MB 7H11 besiyeri 5 ml'lik hacimler halinde eğri olarak katılaştırılır. T2H içeren ve içermeyen besiyeri bulunan tüplere bakterinin standart kültür süspansiyonunun 10^{-2} ve 10^{-4} 'lük dilüsyonlarından 0,2'şer ml ekilir. Kontrol tüplerinde üreme olduğunda, koloniler sayılır. T2H besiyerindeki koloni sayısı, kontrol besiyerindeki %1'inden fazlaysa, suş dirençli olarak kabul edilir. *M.tuberculosis* H37Ra pozitif kontrol olarak, *M.bovis* ise negatif kontrol kullanılabilir^{22,27}.

Sodyum Klorür Toleransı; *M.triviale*, %5 sodyum klorür (NaCl) varlığında üreyebilen ya da tolerans gösterebilen tek yavaş üreyen mikobakteri türüdür. Ayrıca HUM'lerden *M.flavescens*, *M.fortuitum*, *M.phlei* ve *M.smegmatis* de %5 NaCl varlığında üreyebilmektedirler^{21,27}.

Tellürit Redüksiyonu; tellürit redüktaz, renksiz potasyum tellüriti siyah ve metalik olan tellüryum çökeltisine indirgemektedir. Bu test *M.avium* ve *M.intracellulare*'nin diğer nonkromojen mikobakterilerin çoğundan ayrılmasını sağlamaktadır. Bazı hızlı üreyen mikobakterilerde de tellürit testi sonucu pozitif olabilmektedir¹⁷⁻²⁷.

Tween 80 Hidrolizi; Bazı mikobakteri türleri tarafından üretilen lipazlar, bir deterjan olan Tween 80'i (polioksietilen sorbitan monooleat) oleik asit ve polioksietilen sorbitole parçalar. pH'ı yedi olan besiyerindeki nötral kırmızısı, Tween 80 tarafından bağlanarak nötral pH'ta amber rengi oluşur. Tween 80 hidrolize olmuşsa nötral kırmızısını bağlayamaz ve pH yedideki kırmızı renk oluşur. Tween 80 hidrolizi testi yavaş üreyen NTM türlerinin ayırt edilmesinde yararlı olabilmektedir¹⁷⁻²⁷.

Üreaz Testi; üreyi amonyak ve CO₂'e parçalama özelliği, hem skotokromojenleri hem de nonkromojenleri tanımlama etmede yararlı olmaktadır. *M.scrofulaceum* üreaz pozitif, *M.avium* ve *M.intracellulare* üreaz negatiftir^{16,27}.

Karbonhidratların Kullanımı; biyokimyasal testlere ilave olarak uygulanan karbonhidratların (mannitol, inositol, sorbitol, ramnoz ve sitrat) kullanılmasına yönelik

bu test, HUM'lerin (Hızlı Üreyen Mikobakteriler) identifikasyonunda yardımcı olmaktadır. Ancak bu testler için ticari olarak kullanılan besiyeri bulunmamaktadır⁷⁵.

2.10.2.NTM İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler

Klinik örneklerde saptanan mikobakterilerin tür düzeyinde idantifikasyonu amacıyla biyokimyasal testler yerine çoğu zaman moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Mikobakterilerin moleküler yöntemlerle idantifikasyonunda, hedef olarak seçilmiş olan en önemli gen bölgeleri, 16S rRNA, *hsp65*, *recA* ve *rpoB* genleridir. 16S rRNA geni, bakterilerin moleküler idantifikasyonunda altın standart olarak kabul edilen bir hedef bölgedir. Çünkü hem her bakteriye özgü çok iyi saklanmış diziler içerir, hem de her türe göre değişen dizilere sahiptir. Bu değişken dizilerin PCR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir. 16S rRNA geninin dizi analizi tüm mikobakteri türlerinin tanımlanmasını sağlayabilmektedir. Ancak dizi analizi yöntemlerinde, elde edilen bakteri dizilerinin bilgisayar ortamında karşılaştırılması gereken standart dizilere ihtiyaç vardır. Değişik kaynaklardan elde edilmiş standart dizilerde de zaman zaman farklılıklar ortaya çıkabilmekte ve yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Bir standardizasyon sağlamak ve dizi analizi sonuçlarının güvenilirliğini arttırmak amacıyla kurulmuş standart dizi analizi servisleri mevcuttur. Bu servislerden biri olan RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), web tabanlı üzerinde dizi analizi yanısıra fenotipik ve genotipik özellikleri de sunmaktadır. Ayrıca dizi analizi amacıyla üretilmiş olan ticari kitler de mevcuttur. Bunlardan MicroSeq 500 16S rDNA bakteriyel dizi analizi kiti (Applied Biosystems), mikobakteriyel 16S rRNA 5' ucundan 500 baz çiftlik bir bölgenin amplifikasyonunu ve sonrasında dizi analizini sağlayarak tür düzeyinde idantifikasyon gerçekleştirmektedir. 16S rRNA dizilerinin karşılaştırılması mikobakterilerin identifikasyonunda güvenilir bir yöntem olmakla birlikte, *M. gastri* ve *M. kansasii* gibi bazı türlerin ayırte dilmesinde yetersiz kalabilmektedir. Bu gibi türlerin idantifikasyonu amacıyla, *recA* gen dizilerinin karşılaştırılmasından da yararlanılmaktadır. *recA* geni tüm bakterilerde bulunan, DNA hasar onarımı, DNA sentezi ve hücre bölünmesinde rolü olan bir gendir. Bu gen bölgesinin kullanılmasıyla, özellikle 16S rRNA gen dizileri çok benzer çıkan türlerin ayırte dilediği gösterilmiştir^{27,73}.

“Single-stranded conformation polymorphism analysis” (SSCP) yöntemi, mikobakterilerin idantifikasyonunda dizi analizine alternatif olan bir yöntemdir. Bu

yöntemde hedef genin PCR ile çoğaltılmış küçük dizileri kullanılır. Bu diziler ısı ile denatüre edilerek, tek zincirler elde edilir. Tek zincirlerin renatürasyonu sonrasında, farklı dizilerdeki parçalar farklı tersiyer konformasyonlar oluştururlar. Bu parçalar elektroforez ile ayrıştırıldığında, her parça farklı bir hızla hareket eder. Bu yöntem temel olarak genomik DNA'daki nokta mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılır. Bunun yanı sıra son yıllarda, 16S rRNA geninin PCR ile çoğaltılmış parçalarının SSCP analizi, bakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılmaktadır. Mikobakteri türlerinin identifikasyonuna yönelik olarak geliştirilmiş olan SSCP yönteminde, mikobakteriyel 16S rRNA geninin değişken bölgelerine özgül dört ayrı çift iplikçikli parça, dört çift floresan primer ile çoğaltılmakta ve elde edilen ürünlerin SSCP analizi yapılmaktadır. Bu yöntemle PCR sonrasında SSCP analizi sonucu 30 dakika içinde alınabilmekte, kapiller elektroforez sistemi sayesinde aynı anda 16 örnek test edilebilmektedir. Hızlı ve spesifik bir yöntemdir^{17,27,73}.

PCR-restriksiyon enzim analizi yöntemi, mikobakterilerin identifikasyonunda kullanılan pratik ve ekonomik bir yöntemdir. Restriksiyon enzim analizi için çeşitli çalışmalarda 16S rRNA, *hsp65* “heat shock protein” geni ve *rpoB* geni hedef olarak seçilmiştir. Yapılan çalışmalarda, RNA polimeraz enzimini kodlayan *rpoB* geninin dört restriksiyon enzimi ile (*HaeIII*, *HindIII*, *MvaI* ve *AccII*) kesilmesi ile elde edilen bant paternleri, standart bant paternleri ile karşılaştırılarak mikobakteri türlerinin identifikasyonu sağlanmıştır. PCR-restriksiyon enzim analizi yönteminde son yıllarda seçilmiş hedef bölgelerden biri de ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesidir. Bu bölge, 16S ve 23S rRNA'ları kodlayan genler arasında bulunan bir diziden oluşmaktadır. Bu dizide de, her türe özgü farklı nükleotidler bulunması nedeniyle, yapılan çalışmalarda mikobakterilerin identifikasyonu sağlanabilmiştir. Ancak bu bölgedeki polimorfizm oranının çok yüksek olması nedeniyle, sonuçların değerlendirilmesinde bazı zorluklar yaşandığı görülmüştür^{17,27,73}.

65 kDa ağırlığındaki *hsp65* genini hedef alarak yapılan PCR-restriksiyon enzim analizi, geniş bir dağılımda kullanılan mikobakteri identifikasyon yöntemlerinden birtanesidir. *hsp65* geni, hem iyi korunmuş diziler içermekte, hem de türden türe değişiklik gösteren dizilimler bulundurmaktadır. Bu genin 441 baz çiftlik bir dizisi PCR-restriksiyon enzim analizinde çoğaltılarak kullanılmaktadır. İki özgül primer kullanılarak çoğaltılan ürünler, *BstII* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmektedir. Böylece elde edilen restriksiyon parçaları poliakrilamid jelde yürütülerek ayrıştırılmaktadır. Poliakrilamid jel

elektroforezi sonrasında görülen bantın molekül ağırlığının tam olarak anlaşılabilmesi için molekül ağırlık standartı ile karşılaştırılması gereklidir. İki restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda, 80'e yakın mikobakteri türünün herbiri kendine özgü bantlar oluşturduğundan, oluşan bantların molekül ağırlığının belirlenmesi mikobakterilerin idantifikasyonunu sağlamaktadır. Bunun için tek yapılması gereken, örneklerde oluşmuş bantların moleküler ağırlık standartı ile karşılaştırılarak ağırlıklarının saptanması ve hangi türün bantları ile uyduğuna bakılmasıdır. Böylece her örnekte iki restriksiyon enzimi ile oluşturulan parçalardaki bantlar saptanarak NTM türünün ismi belirlenebilmektedir⁷³.

Ancak bazen klasik moleküler ağırlık standartları ile yapılan karşılaştırmalarda, birbirine çok yakın bantların değerlendirilmesinde güçlükler yaşanabilmektedir. Bu güçlüğü aşabilmek amacıyla geliştirilmiş olan bir NTM idantifikasyon kitinde, bilinen mikobakteri türlerinin hem Bst II restriksiyon enzimi ile, hem de Hae III restriksiyon enzimi ile kesildiğinde oluşturacağı olası bant şekillerini içeren iki değişik moleküler ağırlık standartı bulunmaktadır (Diomed). Bu iki moleküler ağırlık standartı ile karşılaştırma yapılırken, elde edilmiş olan bantların tamamının bir karşılığı olduğundan, değerlendirme sırasında hata payı önemli ölçüde azalmaktadır⁷³.

Son yıllarda NTM infeksiyonlarının tanısında mikolik asit analizi de kullanılmaya başlanmıştır. Mikolik asitler mikobakteri hücre duvarının önemli bir kısmını oluşturan uzun zincirli β -hidroksi yağ asitleridir. Her mikobakteri türünde farklı fonksiyonel gruplar ve farklı karbon sayılı mikolik asitler bulunur. Mikolik asitlerdeki karbon atomu sayısı genellikle 60 ile 90 arasında değişir. Bu türe özgü farklılıklar nedeniyle mikolik asit analizi gerçekleştirilerek mikobakterilerin idantifikasyonu yapılabilmektedir. Bu amaçla kullanılan yöntemler "thin-layer chromatography" (TLC), high-performance liquid chromatography" (HPLC) ve "gas-liquid chromatography" (GLC) yöntemleridir. TLC yöntemi uygulanarak, mikolik asitler taşıdıkları ester gruplarına göre 7 grup altında toplanmaktadırlar. Bundan sonraki aşamada, mikobakteri hücrelerinden metil esterifikasyonu ile saflaştırılan mikolik asitler silikon jel üzerinde yürütülmekte ve oluşan paternler standart suşlarla karşılaştırılarak idantifikasyon sağlanabilmektedir. HPLC analizinde, mikolik asitler polarite ve karbon sayılarına göre ayırtelebilmektedir. Daha polar olan ve kısa karbon zincirli mikolik asitler, daha kısa elüsyon zamanlarına sahip olmaktadır. Bu aşamadan sonra elde edilen grafikler (kromatogram), standart suşların grafikleriyle karşılaştırılarak idantifikasyon

sağlanmaktadır. GLC yönteminde ise sadece mikolik asitler değil, mikobakteri hücre duvarının bütün yağ içeriği analiz edilerek identifikasyon yapılmaktadır. Bu üç mikolik asit analiz yöntemi içinde en güvenilir sonuçlar elde edilen yöntem HPLC yöntemidir. TLC ve GLC yöntemleriyle bazı mikobakteri türleri aynı paternleri verdiği için, her türün identifikasyonu mümkün olmamaktadır⁷³.

Ticari identifikasyon propları olarak Strip testlerinde piyasada iki farklı prob testi bulunmaktadır. Bunlardan INNO-LiPA Mycobacteria version 2 (Innogenetics, Ghent, Belcika) 16S-23S rRNA bölgesini (ITS- intemal transcribed spacer), GenoType Mycobacteria (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) ise 23S rRNA genini hedef almaktadır^{27,76}.

Strip testleri; biyotinlenmiş PZR ürünlerinin, paralel halde bir membran şerit üzerine sabitlenmiş tamamlayıcı proplarıyla revers hibridizasyonuna dayanmaktadır. Hibridizasyonun gerçekleşmesi durumunda, INNO-LiPA Mycobacteria version 2'de kullanılan streptavidin ile işaretlenmiş enzim, GenoType Mycobacteria'da ise kromojenik substrat kullanılması nedeniyle renkli bantlar oluşmaktadır. Bu testler katı ya da sıvı besiyerinde üremiş kültürlerle, hatta bazıları ise doğrudan hastadan alınan muayene maddesine uygulanabilmektedir. Bu kitlerle klinik örneklerden en sık izole edilen mikobakteri türlerinin identifikasyonu yapılabilmektedir. Bu kitlerle elde edilen sonuçlar; AccuProbe, PZR-REA ya da 16S rRNA geninin dizi analizi yöntemlerinin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlarla uyumludur. GenoType Mycobacteria'nın piyasada NTM'lerin identifikasyonuna yönelik üç ayrı kiti bulunmaktadır. Bunlardan GenoType Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) MTBC'nin ve sık izole edilen 13 NTM türünü, GenoType Mycobacterium As (Additional Species) CM kitindekilerden farklı 16 NTM türünü ve GenoType Mycobacteria Direct ise doğrudan hasta örneğinden ya da kültürden MTBC ve bazı NTM türlerini (*M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii* ve *M.malmoense*) tanımlayabilmektedir^{27,76}.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma ‘Düzce ili içme ve kullanma sularında Atipik mikobakteri izolasyon ve tanımlanması’ proje başlığı, 2015.04.01.299 proje nosu ile Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Çalışmaya 28.10.2016 ile 10.12.2016 tarihleri arasında Düzce il merkezi, merkeze bağlı köy ve mahalleler, Akçakokca ilçe merkezi ve ilçeye bağlı köy ve mahallelerden alınan toplam 120 su örneği dahil edildi. Alınan su numuneler 2x1000 mL plastik kaplarda, soğuk zincir koşullarına uyarak ile Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Moleküler Mikrobiyoloji Labortuvarına getirildi. Laboratuvara getirilen örnekler en geç 24 ila 48 saat içerisinde NTM varlığı açısından incelendi. Tüm örneklerin alındığı bölgedeki suların sıcaklık dereceleri kaydedildi.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan sarf malzemeler

Plastik su taşıma kabı 1000 mL (OR-BAK Türkiye)

0.45mm por çapı 47mm çapında Steril filtre (FILTER-LAB GriddedMCE membran)

Ph stribi (MColorplast)

Klor stribi(ChemBİO)

3.1.2. Bakteriyolojik Cihazlar

0.5 Litrelik Su filtrasyon düzeneği (Isolab Germany/Lab Br)

Vakum pompası (Bio Rad)

Otomatik pipet (1000’lik ve 100’lük Hamilton)

Ph ölçer cihaz (Hanna)

BACTEC MIGIT 320 (Becton, Dickinson and Company, New Jersey ABD)

3.1.3 Kullanılan Besiyeri, Boya ve Kimyasallar

3.1.3.1 Löwenstein-Jensen Besiyeri (LJ) Aşağıda içeriği belirtilen besiyeri ticari olarak hazırlanmış şekilde satın alınarak kullanıldı (PRE-MED-Türkiye).

Besiyeri içeriği;

- Monopotasyum fosfat 2.5g
- Malaşit yeşili 0.4g
- Magnezyum sülfat 0.24g
- Gliserol 12ml
- Sodyum sitrat 0.26g
- Patates unu 30g
- L-asparjin 3.6g
- Suplementler Cycloheximide 0.64mg/L - Nalidixic asid 56mg/L - Lincomisin 3.2mg/L

3.1.3.2 Middlebrook 7H11 Agar (Himedia-Hindistan)**Besiyeri içeriği:**

- Kazain enzim hidrat 1 Gms/Litre
- Amonyum sülfat 0.50 Gms/Litre
- Monopotasyum fosfat 1.50 Gms/Litre
- Disodyum fosfat 1.50 Gms/Litre
- Sodyum sitrat 0.40 Gms/Litre
- Magnezyum sülfat 0.05 Gms/Litre
- L-Glutamik Asit 0.50 Gms/Litre
- Ferrik amonyum sitrat 0.04 Gms/Litre
- Pyridoxine 0.001 Gms/Litre
- Biotin 0.0005 Gms/Litre
- Malaşit yeşili 0.001 Gms/Litre
- Agar 15.00 Gms/Litre
- OADC 50ml/450ml

Hazır toz halinde alınmış besiyerinden 10.25g hassas terazide tartılarak 450 ml lik distile suda üzüldü. İçerisine 2.5g gliserol eklendi ve steril bir şekide şişenin ağzı kapatılarak otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyonu tamamlanan besiyeri 50°C'ye kadar soğuması için oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra içerisine hazır halde olan 50ml'lik OADC eklendi ve homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı.

Hazır haldeki besiyeri steril petri kaplarına 2 mm yükseklik seviyesinde dağıtıldı. Kullanıma hazır hale gelen besiyeri +4°C de muhafaza edilmek üzere dolaba kaldırıldı.

3.1.3.3 Mycobacteria Growth Indicator Tube 7mL BD (New Jersey -ABD)

Besiyeri içeriği:

- Modifiye middlebrook 7H9 Broth base 5.9g
- Casein pepton 1.25g
- Bovine albumin 50.0g
- Dextrose 20.0g
- Polyoxyethylene stearate (POSE 1.1g
- Katalaz 0.03g
- Oleik asid 0.1g
- Supliment: Polymyxin B,Amphotericin B,Nalidixic asid,Trimethoprim, Azlocilin

BACTEC MGIT 960 cihazıyla uyumlu olarak çalışan MGIT besiyeri hazır halde ticari olarak satın alındı. MGIT besiyeri, cihazına verilmiş ve üreme cihaz yoluyla gözlenmiştir. MGIT tüblerinin dip kısmındaki jelde bulunan özel işaretlenmiş ve kültür sıvısında bulunan oksijene duyarlı floresans madde üremenin olduğu anda ortmdaki osijen emilimiyle birlikte oksijen miktarının azalmasına duyarlılık gösterip, jel içinden sıvıya karışarak floresan bir ışıma oluşturması ve cihazın buna duyarlı okuma yapip üreme sinyali verme esasına dayalı bir besiyeridir.

3.1.3.4.Erich- Ziehl-Neelsen Boyama (Aside Dirençli Boyama, ARB)

Karbol Fuksin :

- Bazik fuksin 1.0g (HIMEDIA)
- Etanol %95 10.0ml (HIMEDIA)
- Kristalize fenol (HIMEDIA)
- Steril distile su

5 g fenol, 100 ml saf suda eritilip % 5 eriyik hazırlandı. Bunun 50 ml'si 100 ml'lik bir balon jojeye aktarıldı. 1 g bazik fuksin, cam bir havanda ezilirken 10 ml alkol ile

karıştırılarak eritildi. Bu eriyik balon jojedeki fenollü suya eklendi. Arta kalmış fenollü su, azar azar havana dökülüp boya tortusu yıkandı ve bu yıkantı suyu da balona aktarıldı. Bu suretle balon jojedeki 100 ml işareti kadar devam edildi. Eriyik 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra kağıt süzgeçten süzüldü. Sonrasında koyu ışık geçirmeyen bir şişede saklandı²¹.

Metilen mavisi solusyonu

Zıt boyama için kullanılan kimyasal boyadır ve aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır. Etanol %95'lik 30.0mL - %10'luk Potasyum hidroksit 0.1g –Distile su 100 mL havanda metilen mavisi alkol ile ezilerek eritildi. Bir balon jojeye aktarıldı. Aynı bir yerde 100 ml saf suya % 10'luk KOH eriyiğinden 0.1ml eklenerek karıştırılır. Boyanın eritilmiş olduğu havan bu su ile yıkanıp boya eriyiğine aktarıldı. Suyun tamamı eklenip karıştırıldıktan ortalama 24 saat süreyle oda ısısında bekletildikten sonra süzülerek saklama kabına alındı²¹.

Asit – Alkol Çözeltisi (Dekolorizasyon işleminde)

Hidroklorik Asit 3.0mL ve %95'lik Etanol 97mL karışımından oluşturuldu²¹.

3.1.3.5 Dekontaminasyon işleminde kullanılan malzemeler

- **%4'lük NaOH**
 - Sodyum hidroksit 40g
 - Steril distile su 1000mL
- **%2'lik NaOH**
 - Sodyum hidroksit 20g
 - Steril distile su 1000mL
- **Setilprinidyum klorid (Cetrimide-sikloheksimide)**

3.1.3.6 Sudaki klor miktarının belirlenmesi ve nötralizasyonu için kullanılan kimyasallar:

- O-Tolidine ayırıcı
- Sodyum tiyosülfat

3.1.4 PCR testi için kullanılan cihaz ve ekipmanlar

- Thermal cycler (Bio Rad İQ5 – Anatolia geneworks)
- Twincubator (Hain Lifescience, Nehren Almanya)
- GenoType Mycobacteria CM (Common Mycobacteria) (Hain Lifescience, Nehren, Almanya)
- GenoType Mycobacteria AS (Common Mycobacteria) (Hain Lifescience, Nehren, Almanya)

3.2 Yöntem

3.2.1. Su örneklerinin toplaması

Mikobakteri türlerinin izolasyonu için farklı kaynaklardaki su örnekleri steril bir şekilde toplandı. Örnekler toplanmadan önce sterilizasyonu amacı ile musluk ve çevresindeki ortam pamuk-alkol ile yapılan alevle havadaki yada musluk ağzındaki kontaminasyon oluşturabilecek mikroorganizmalardan temizlendi. Aynı şekilde steril kaplar, ağızlarını açıp kapatırken de alevden geçirilerek bu işlem tekrarlandı. Örnekler musluk sularının açılıp bir yada iki dakika boşa akıtıldıktan sonra steril 1(bir) litrelik kaplara aynı kaynaktan iki steril kap olacak şekilde toplamda 2 (iki) litre olarak alındı. Toplanan su örnekleri sıcaklık ölçümleri yapıp kaydedildikten sonra laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvara getirilen örneklerden, 24-48 saat içinde pH ve klor miktarlarının ölçümü, dekontaminasyon, filtrasyon ve besiyerlerine ekim işlemleri yapıldı.

3.2.2. Örneklerin pH ve klor miktarlarının belirlenmesi

Laboratuvara getirilen örneklerden falkon tüplerine 10 ml alınarak, pH sribi ve pH ölçer cihaz ile pH düzeyi belirlendi⁵². Farklı bir falkon tüpüne 10 ml su alınarak klor miktarını ölçümü için klor sribi ve 2-3 damla O-toludin ayracı ile klor miktarı ölçümü yapıldı. Klor sribindeki renk değişimi ve ayıraçtaki renk değişimleri kitin üzerindeki skladan bakılarak ölçüm değerleri kaydedildi⁸⁷. Klor miktarlarının yüksek olduğu örneklerde çalışma öncesi 1 (bir) litrelik su örneğine 100 gram sodyum tiyosülfat eklenerek klor nötralizasyonu sağlandı^{77,78}. Klor düzeyi 0.3 ppm düzeyinin altında olan örneklerde bu işlem uygulanmadı.

3.2.3.Örneklerin izolasyonu

Klor ve pH miktarlarının tespitinden sonra dekontaminasyon işlemi uygulandı. Yurt içi ve yurt dışında yapılan çalışmalarda, sulardaki atipik mikobakteri izolasyon yöntemlerinde farklı dekontaminasyon kimyasalları farklı aşamalarda ve farklı yoğunluklarda kullanılmıştır^{77,78,79,80,81,82}. Çalışmamızda filtrasyon öncesi dekontaminasyon yöntemi seçilmiştir. Bunun için örneklerin ilk 20 tanesi 1 litrelik steril kaplara ayrılmıştır. Her bir kap %0.005 lik setilprinyum klorid ve %2'lik NaOH ile 15-20 dakika dekontamine edilmiştir⁷⁹.

Filtrasyon sonucu besiyerine ekimler yapılmış, ekim sonucu üreme saptanan besiyerlerinden ARB boyaması uygulanmıştır. Yapılan boyamada kontamine mikroorganizma varlığının fazla olması nedeniyle, %0.005' lik setilprinyum klorid ve %2'lik NaOH ile yapılan dekontaminasyon işleminden vazgeçilmiş ve NaOH ile dekontaminasyon oranı %2'den %4'e çıkarılmıştır. Ancak bu ilk 20 numunenin alındığı yerlerden tekrar örnek alınarak %4'lük NaOH ile dekontaminasyon ve filtrasyon işlemi tekrarlanmıştır^{81,82,83}. Böylece tüm örneklerde %4'lük NaOH ile dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır.

Dekontaminasyon sonrasında yoğunlaştırmak için filtrasyon yöntemi kullanılmıştır. Aynı kaynaktan alınan 2000 ml su örneğini ilk 1000 ml'si 0.45mm por çaplı, 47mm çapında filtre ile filtre edilmiş ve MGIT besiyerine bu örneğin süzüldüğü filtre yerleştirilmiştir. Aynı kaynaktan alınan suyun kalan 1000 ml'lik kısmı ise ikinci bir filtre ile filtre edilmiş ve bu suyun süzüldüğü filtre ikiye bölünerek LJ ve Middlebrook 7H11 besiyerlerine aktarılmıştır^{77,78,79,80,81,82,83}. Bu şekilde NTM etkenleri ve dekontaminasyondan kalan diğer etkenler filtre yüzeyinde kalması sağlanmıştır^{79,81,82,83}. Filtrasyon düzeneğinin etkili çalışması için negatif hava basıncını oluşturacak vakum pompası kullanılmıştır. Filtrasyon ortalama 15-20 bar basınçla gerçekleştirilmiştir. Farklı bir örneğe geçilmeden önce kontaminasyonu engellemek için filtrasyon düzeneği %10'luk çamaşır suyu ile temizlenip steril distile su ile durulanmıştır.

3.2.4 Örneklerin kültür işlemleri ve identifikasyonu

Örneklerin dekontaminasyon ve filtrasyon işleminin ardından, düzenekte kullanılan filtreler steril bir öze ve steril bir pens yardımı ile alınarak LJ, Middlebrook 7H11 ve

MGİT besiyerlerine yerleştirilmiştir^{79,81,82,84}. Bu şekilde bir su örneği için, ilk 20 örnek toplam altı adet besiyeri kullanıldı. Ancak besiyerlerinde boyama sonucu saptanan kontaminasyon neticesinde bu ilk yirmi örnek için %4'lük NaOH ile dekontaminasyon işlemi tekrar edilerek elde edilen materyalin kültür işlemi yeniden yapıldı. Bu şekilde tüm numuneler %4'lük NaOH ile dekontaminasyonu yapılan örnekler olarak elde edildi ve her bir numune üç farklı besiyerine ekildi. LJ ve Middlebrook 7H11 agar besiyerleri etüve yerleştirilirken, MGIT besiyeri ise BACTEC MGIT 960 cihazına yerleştirilerek inkübe edildi. LJ ve Middlebrook 7H11 agar besiyerinde, ilk 24-48 saat sonunda kontaminasyon varlığı ARB yöntemi ile kontrol edilip kontamine besiyerleri atıldı. İnkübasyon süresi boyunca sinyal veren MGIT besiyerinden yapılan boyamalar sonucunda asidorezistan özellik göstermeyen örnekler kontamine olarak değerlendirildi. ARB incelemelerinde preparatların içerisinde hem asidorezistan boyanma özelliği gösteren basiller hemde asidorezistan boyanmamış diğer mikroorganizmaların varlığı görüldüğünde yeniden dekontaminasyon işlemi yapıldı. Bunun için MGIT şişesinde bulunan sıvı besiyeri, 50 ml lik steril falkon tüpüne alındı ve 1/1 oranında %4'lük NaOH eklenerek tekrar dekontamine edildi. Dekontaminasyon ve santrifüj sonucu tüpünün alt kısmında kalan materyal yeni MGIT şişesine tekrar ekim işlemi yapılarak BACTEC cihazına yerleştirildi.

Asido-rezistans boyanma özelliği gösteren LJ ve Middlebrook 7H11 besiyerindeki koloniler alınıp homejen bir şekilde steril distile su ile sulandırılarak yeni besiyerlerine pasajları yapılarak saf kültür elde edildi.

Bu tekrar dekontaminasyondan ve saf kültür elde etmekteki amacımız gen izolasyonu ve PZR'da farklı mikroorganizmaya ait DNA bölgelerinin bulunmasını engellemek ve hibridizasyon işleminde saf gen bölgeleri oluşturmaktır.

Besiyerlerinde üreme varlığı 5-7 gün aralıkla takip edildi. Örnekler, LJ ve Middlebrook 7H11 agar besiyerlerinde sekiz hafta sonuna kadar, MGIT besiyeri ise altı hafta boyunca izlendi. Bu sürenin sonunda üreme sinyali vermeyen MGIT besiyerleri değerlendirme dışı bırakıldı. Üreme sinyali veren MGIT besiyerinden yada koloni oluşumu gözlenen LJ ve Middlebrook 7H11 besiyerlerinden alınan mikroorganizmalar aside dirençli boyama (ARB) yöntemi ile asido-rezistans bakteriler varlığı açısından incelendi^{84,101}. Asido rezistans boyanma özelliği göstermeyen numuneler kontaminant olarak değerlendirildi⁸⁴.

3.2.4.1 Aside Dirençli Bakterilerin Boyanması

Hem MGIT hemde LJ ve Middlebrook 7H11 besiyerilerinden alınarak lama yayılıp havada kurutulan örnekler, alevde tespit edildikten sonra, boyama küveti üzerindeki tel boyama sehпасına yerleştirildi. Üzerine preparatı tam kapatacak şekilde bolca fenollu fuksin (korbol fuksin) eriyiğinden döküldü. Preparat burada buhar çıkacak ancak kaynamayacak şekilde alttan ısıtıldı. Bunun için sert bir telin ucuna pamuk sarılarak etil alkolle temas ettirilerek yakılmıştır. Bu alev zaman zaman preparatın altına yaklaştırılıp uzaklaştırılarak iki dakika süre ile buhar çıkacak ancak kaynamayacak derecede preparat ısıtıldı. Bu arada preparatın üzerindeki boya eriyiği azalırsa üzerine damla damla boya eklenerek preparatın kurumaması sağlandı. Bu süre sonunda preparat su ile yıkandı. Daha sonra renksizleştirme işlemi yapıldı. Bunun için asit alkol eriyiği kullanıldı. Bir pens ile tutulan preparatın üzerine asit alkol eriyiği döküldü. Preparat sağa sola eğdirilip hareket ettirilerek işlem kaç kez yenilendi. Yaklaşık bir dakikalık süre sonunda renksizleştirme işlemi tamamlanmış oldu. Renksizleştirme işlemi sonrasında preparat su ile yıkandı. Daha sonra karşıt boyama için Löfflerin metilen mavisi eriyiği kullanıldı. Boya preparata dökülüp 3-5 dakika beklendikten sonra su ile yıkandı. Preparat havada kurutularak immersiyon objektifiyle incelendi.

Bu boyama ile mavi zemin üzerinde; zemini oluşturan hücreler, lifler, asidorezistan olmayan diğer bakteriler mavi renkte, koyu parlak kırmızı renkte boyanan bakteriler aside dirençli mikroorganizma olarak kabul edildi²¹.

3.2.4.2 Gen izolasyonu ve İdentifikasyonu

Araştırmamızda besiyerlerinde aside dirençli olarak izole edilen mikroorganizmalara moleküler yöntemlerle identifikasyonu yapılmıştır.

İdentifikasyon için GenoType Mycobacteria CM ve GenoType Mycobacteria AS kitleri prosedürlerine uygun olarak kullanılmıştır^{85,86}. Önce biyotin ile işaretli primer bölgelere multipleks amplifikasyon işlemi yapılmıştır. Çalışmanın son kısmında ise aynı kitte bulunan prosedüre göre revers hibridizasyon yöntemi ile NTM türlerinin identifikasyon işlemi tamamlanmıştır. Sık izole edilen NTM'ler için kullanılan Geno Type Mycobacteria CM kullanılmış, daha az görülen türlerin tanımlanmasında kullanılan Geno Type Mycobacteria AS kiti ile revers hibridizasyon işlemi yapılmıştır^{85,86}.

LJ ve Middlebrook 7H11 besiyerinden daha önce pasaj yapılarak elde edilen saf koloniler, 1ml lik DNA ve RNA içermeyen distile su ile homojenizasyonu yapılmıştır. Bu örnekler daha onra 1.5 ml'lik DNA ve RNA steril içermeyen vidalı kapaklı ependorf tüplerine konulmuş ve kit prosedüründeki izolasyon aşamaları uygulanmıştır. MGIT besiyerinde üremesi olan örneklerden saflaştırma işleminin ardından otomatik pipet yardımı ile 1ml numune alınmış steril 1.5 ml'lik vidalı kapaklı ependorf tüpe aktarılmıştır.

Hem katı hem sıvı besiyerinden ependorf tüplerine alınmış örnekler, soğutmalı satrifüjde 12000 rpm'de 15 dakika süre santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kit posedürüne uygun olarak santrifüj edilen örneğin üst kısımdan 500 ila 700µl'lik miktar otomatik pipetle yardımı ile alınarak atılmıştır. Örneğin kalan kısmına kit içeriğinde bulunan Lysis buffer'dan otomatik pipet yardımı ile 100µl eklenmiş ve pipet ile homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. Örnek 95°C de kaynar suda 5 dakika inkübe edilmiş ve ardından 100µl nötralizasyon buffer eklenerek 5 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası örnek sıvısının üst kısmından polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) amplifikasyon için kullanılmak üzere 100µl alınmıştır. Amplifikasyon karışımı kit içeriğindeki uygulama prosedürüne göre örnek başına 45µl olarak hazırlanmıştır. Hazırlanma aşaması laboratuvarın mikroorganizma DNA'sı içermeyen temiz alan olarak kullanılan PCR bölümünde yapılmış ve PCR'a uygun özel tüplere konulmuştur.

Amplifikasyon karışım içeriği aşağıdaki bileşenlerden oluşmaktadır.

- | | |
|--|------|
| • Nükleotit ve primer içeren karışım (PNmix) | 35µl |
| • 10x Polimeraz bufffer | 5µl |
| • MgCl ₂ | 2µl |
| • Su | 3µl |

Hazırlanan PCR karışımının içine pozitif örnek DNA'sından 5µl eklenerek, Thermal cycler cihazına yerleştirilmiştir. Kite uygun PCR programı yüklenerek amplifikasyon başlatılmıştır. PCR programı çalışma süreci Tablo 2'da göstermiştir.

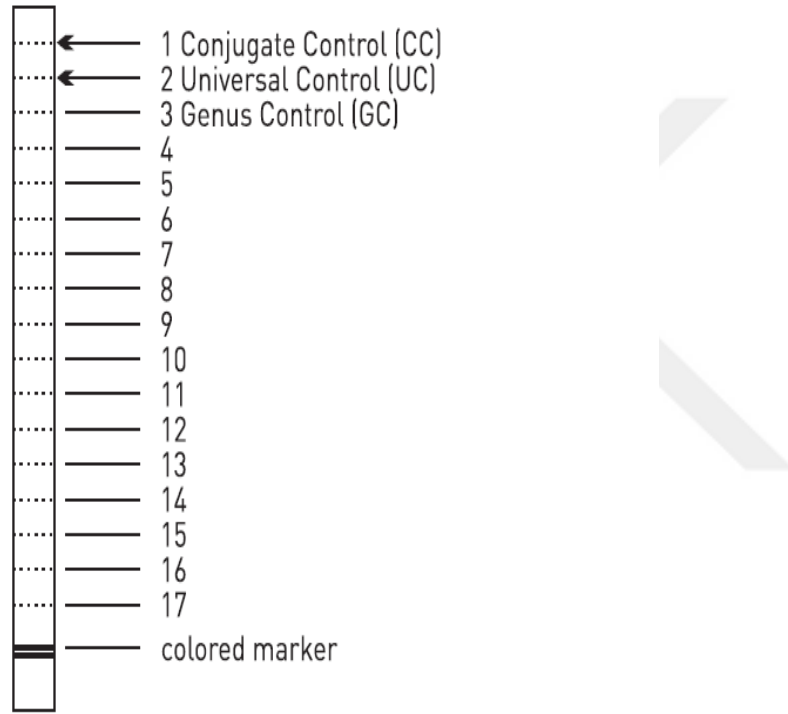
Tablo 2. PCR çalışma döngüsü

Sıcaklık (°C)	95 °C	95 °C	58 °C	95 °C	53 °C	70 °C	70 °C
Süre (dakika / saniye)	15 dakika	30 saniye	2 dakika	25 saniye	40 saniye	40 saniye	8 dakika
Döngü sayısı	PCR öncesi	10 döngü		20 döngü		PCR sonrası	

PCR işlemi sonrası kit prosedürüne uygun olarak hibridizasyon solusyonları ve Twincubator cihazı hazırlanmıştır. Bunun için hibridizasyon kiti içinde bulunan sıvılardan konsantre konjugat ve konsantre substrat haricindeki solüsyonlar oda ısısında kristalleşmeler yok oluncaya kadar bekletilmiştir. Konsantre substrattan (SUB-C) ve konsantre konjuganttan (CON-C) 1/100 oranında sulandırma yapılarak tekrar +4°C’de muhafaza edilmiştir. Hibridizasyon işlemi öncesinde stringent wash solution (STR) 37-45°C ye kadar ısıtılmıştır.

Hibridizasyon işleminde prosedüre uygun olarak hazırlanmış strip yıkama kuyucukları kullanılmıştır. 20µl denatürasyon solusyonu kuyucuk içerisine pipetlendikten sonra, PCR işlemi tamamlanmış pozitif örnekten de 20µl pipet yardımı ile aynı kuyucuk içerisine aktarılıp karıştırılmıştır. Karışım 5 (beş) dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda strip yıkama kuyucuklarındaki karışıma 1ml hibridizasyon solusyonu (HYB) eklendi ve homojen oluncaya kadar çalkalandı. Çalışılacak her örnek için strip yıkama kanallarına bir strip eklendi. Strip yıkama kuyucuğu kendine uygun olarak tasarlanmış olan Twincubator’e yerleştirildi ve 45°C de 30 dakika boyunca cihazın çalkalama işlemi ile birlikte inkübasyon sağlanmış oldu. 30 dakika sonunda HYB solüsyonu pipet yardımı ile kuyucuklardan boşaltıldı ve her kuyucuğa 1ml STR solüsyonu eklendi. 15 dakika 45°C deki Twincubator’de inkübe edildi. Bu süre sonunda STR solüsyonu tekrar pipet yardımı ile boşaltıldı, her kuyucuğa 1ml yıkama solüsyonu (RIN-rinse solusyon) eklenerek yıkama işlemi çalkalama ile birlikte oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Bundan sonraki aşamalar kit prosedürüne uygun olarak oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Yıkama işlemi sonunda rinse solusyonu pipet yardımı ile kuyucuklardan alınarak atıldı. Önceden hazırlanmış olduğumuz 1/100 oranındaki konjugant kuyucuk başına 1mL eklenerek 30 dakika çalkalanarak inkübe edilir.

Bu işlemin ardından konjugat boşaltıldı ve kuyucukda bulunan stripler 1ml RNS solüsyonu ile iki defa, 1ml distile su ile de bir defa çalkalanarak yıkama yapılır. Yıkama işleminde kullanılan sıvılar kuyucuktan boşaltıldıktan sonra, önceden hazırlanmış 1/100 oranındaki subsrattan her bir kuyucğa 1ml eklenerek karanlık ortamda 3 -20 dakika arasında bant oluşumu gözleninceye kadar inkübe edilir. Bu süre sonunda subsrat solüsyonu boşaltıldı ve iki defa 1ml distile su ile stripler yıkanıp kurutmaya alınarak ve değerlendirme için kullanılır. Geno Type Mycobacteria CM ve AS stripleri ve prob bölgeleri Şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4. Geno Type Mycobacteria CM ve AS stripleri ve prob bölgeleri

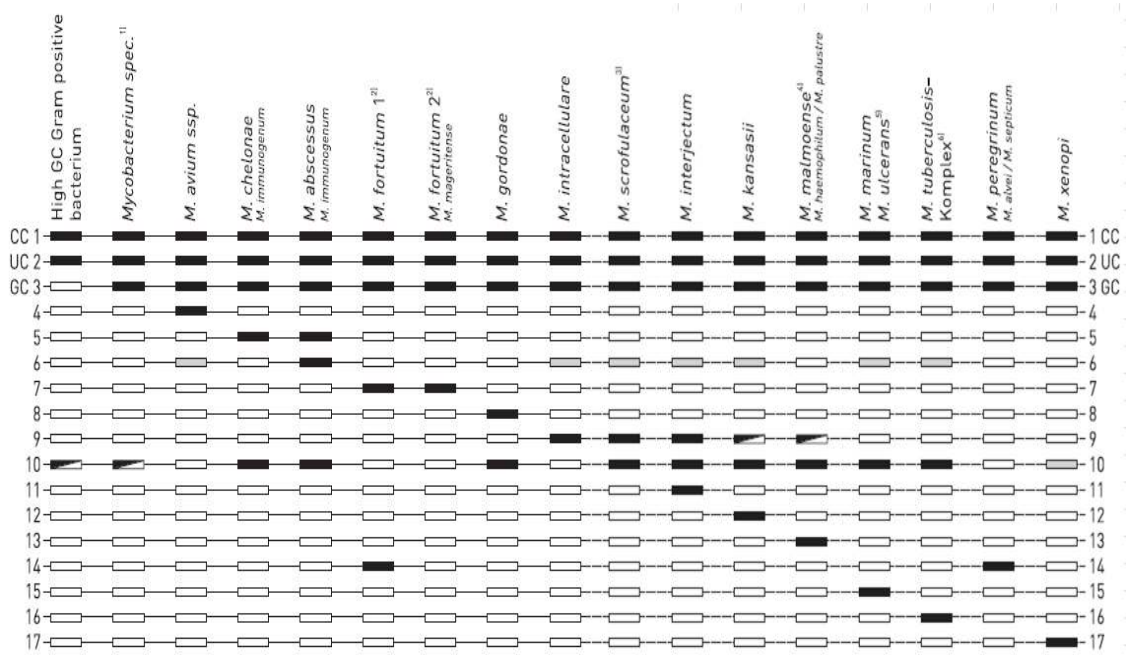
CC (Konjugant kontrol bölgesi): Strip yüzeyindeki konjugant bağlanma ve subsrat reaksiyon verimliliğini gösteren bölgedir. Hibridizasyonun gerçekleşmiş olması bu bölge ile kontrol edilir ve bu bölgede bant oluşmaması değerlendirmenin yapılamayacağını gösterir.

UC (Universal kontrol bölgesi): Tüm mikobakteriler ve fazla sayıda Guanin + Sitozin (G+S) içeren Gram pozitif bakterileri tanımlamaktadır.

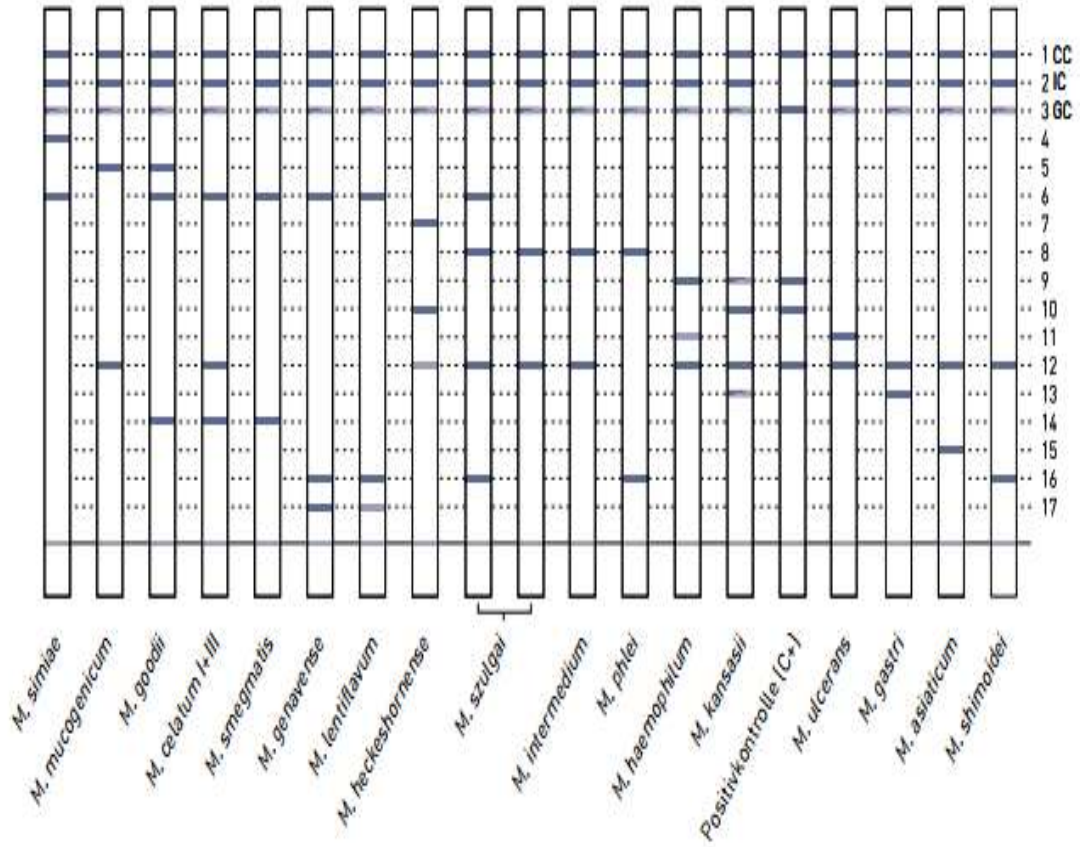
UC kontrol bantları ve CC kontrol bantları oluşmuş ancak herhangi bir mikobakteriye özgü bant bölgeleri oluşmamış ise bu bakteri türünü tanımlamada farklı yöntemler kullanılmalıdır.

GK (Genus Kontrol): Mikobakteri türünü gösteren bölgedir. Bant üzerindeki gözlenen titre yoğunluğu mikobakteri türüne göre değişiklik göstermektedir. Bazen mikobakteri türüne özgü bant bölgeleri oluştuğu halde cins kontrol bölgesinde bir bant görünümü meydana gelmeyebilir. Bu durumda amplifikasyon gerçekleşmiş ve sonuçlar değerlendirmeye kabul edilir. Genus kontrol bölgesinde bant oluşumu yoksa ve herhangi bir mikobakteri türünü gösteren bant bölgesi oluşmamış ise bu türün yüksek G+S içeren Gram pozitif bakteri olduğu düşünülür.

Şekil 5 ve 6'da Geno Type Mycobacteria CM ve AS kiti ile çalışılan mikobakteri bant bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 5. Geno Type Mycobacteria CM kiti ile çalışılan mikobakteri bant bölgeleri.



Şekil 6. Geno Type Mycobacteria AS kiti ile çalışılan mikobakteri bant bölgeleri

3.3. İstatistiksel değerlendirme

Çalışmanın istatistiksel olarak verileri; sürekli değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma, kategorik değişkenler için frekans ve yüzde şeklinde özetlenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler SPSS v.22 paket programı ile hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

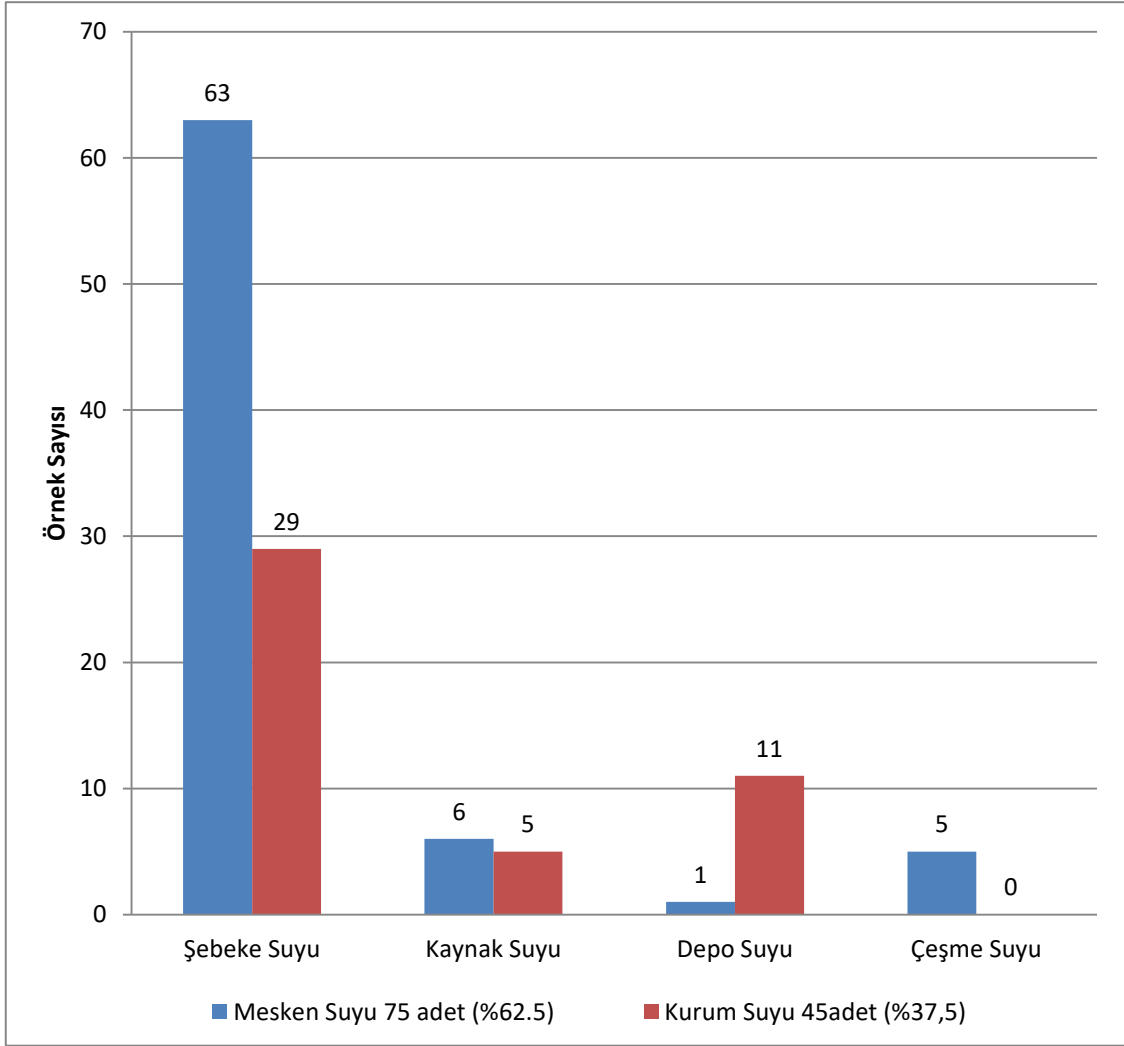
Araştırmamıza Düzce ilindeki çeşitli su kaynaklarından 120 farklı su örneği alınmıştır. Örnekler şebeke suyu, depo suyu, kaynak suyu ve çeşme suyu olarak sınıflandırılmış ve alındığı yerin mesken yada kurum olup olmadığı kaydedilmiştir. Şebeke suları ile şehir, ilçe, köy ve mahalle şebeke suları belirtilmektedir. Depo suları ise şebeke kaynaklı depolanmış sulardır. Kaynak suları herhangi bir şebekeye dahil olmaksızın direk kullanılan sulardır. Çeşme suları ise mahalle, köy sokak yada meydanlarında bulunan şebekeyle ilişkili yada ilişkisiz çeşmelerden alınan sulardır. Mesken suları evlerdeki çeşmelerden alınan su örneklerini belirtmektedir. Kurum suları ise çeşitli kurumlardan alına su örneklerini kapsamamaktadır. Kurumlardan alınan su örneklerinde kurumların adı kaydedilmiş ancak araştırma içerisinde bu isimler açıklanmamıştır. Kurumlar eğitim, sağlık ve ibadethanelerden oluşmaktadır.

Çalışmaya dahil edilen suların alındıkları yere göre dağılımı Tablo 3' ve Grafik 1'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Örneklerin alındığı yerlere göre dağılımı

Alındığı yer	Mesken suyu	Kurum suyu	Toplam
Şebeke suyu	63	29	92
Kaynak suyu	6	5	11
Depo suyu	1	11	12
Çeşme suyu	5	-	5
Toplam	75	45	120

Grafik 1. Toplam örnek dağılımı



Su numuneleri toplanırken suların alındığı andaki sıcaklıkları ölçülmüş, laboratuvarda ise suların serbest klor miktarı ve pH değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Tablo 4’de örneklerin alındıkları andaki sıcaklıkları ile laboratuvarda ölçülen serbest klor miktarları ve pH değerleri gösterilmektedir.

Tablo 4. Örneklerin pH sıcaklık ve serbest klor miktarları.

Örnek No	pH	Sıcaklık (°C)	Serbest Klor Miktarı	
			ppm	mg/L
1. ÖRNEK	6,3	6,1	<0,3	<0,15
2. ÖRNEK	7,3	10,6	<0,3	<0,15
3. ÖRNEK	6,7	8,9	<0,3	<0,15
4. ÖRNEK	7,9	11,4	<0,3	<0,15
5. ÖRNEK	6,1	9,6	<0,3	<0,15
6. ÖRNEK	6,9	10,9	<0,3	<0,15
7. ÖRNEK	7,9	6,1	<0,3	<0,15
8. ÖRNEK	7,8	7,4	<0,3	<0,15
9. ÖRNEK	7,8	5,6	<0,3	<0,15
10. ÖRNEK	7,9	8,6	<0,3	<0,15
11. ÖRNEK	7,6	10,9	<0,3	<0,15
12. ÖRNEK	7,9	10,6	<0,3	<0,15
13. ÖRNEK	7,5	10,3	<0,3	<0,15
14. ÖRNEK	6,1	6,9	<0,3	<0,15
15. ÖRNEK	7,9	6,8	<0,3	<0,15
16. ÖRNEK	7,1	9,7	<0,3	<0,15
17. ÖRNEK	7,9	6,6	0,4	0,15
18. ÖRNEK	7,6	6,7	<0,3	<0,15
19. ÖRNEK	7,3	9,6	<0,3	<0,15
20. ÖRNEK	7,8	9,7	<0,3	<0,15
21. ÖRNEK	7,9	6,7	<0,3	<0,15
22. ÖRNEK	8,1	7,7	<0,3	<0,15
23. ÖRNEK	7,6	6,9	<0,3	<0,15
24. ÖRNEK	6,9	7,5	<0,3	<0,15
25. ÖRNEK	7,4	5,7	<0,3	<0,15
26. ÖRNEK	7,4	9,6	0,4	0,15
27. ÖRNEK	7,4	5,4	0,4	0,15
28. ÖRNEK	7,6	5,9	0,5	0,40
29. ÖRNEK	7,4	5,6	<0,3	<0,15
30. ÖRNEK	7,9	6,3	<0,3	<0,15
31. ÖRNEK	7,6	7,2	<0,3	<0,15
32. ÖRNEK	7,9	6,6	<0,3	<0,15
33. ÖRNEK	7,1	5,4	<0,3	<0,15
34. ÖRNEK	6,8	7,7	<0,3	<0,15
35. ÖRNEK	7,2	5,7	0,4	0,3
36. ÖRNEK	7,4	4,8	<0,3	<0,15
37. ÖRNEK	6,7	9,8	<0,3	<0,15
38. ÖRNEK	6,9	7,4	<0,3	<0,15
39. ÖRNEK	7,9	6,3	<0,3	<0,15
40. ÖRNEK	7,6	5,9	<0,3	<0,15

Tablo 4. Devamı

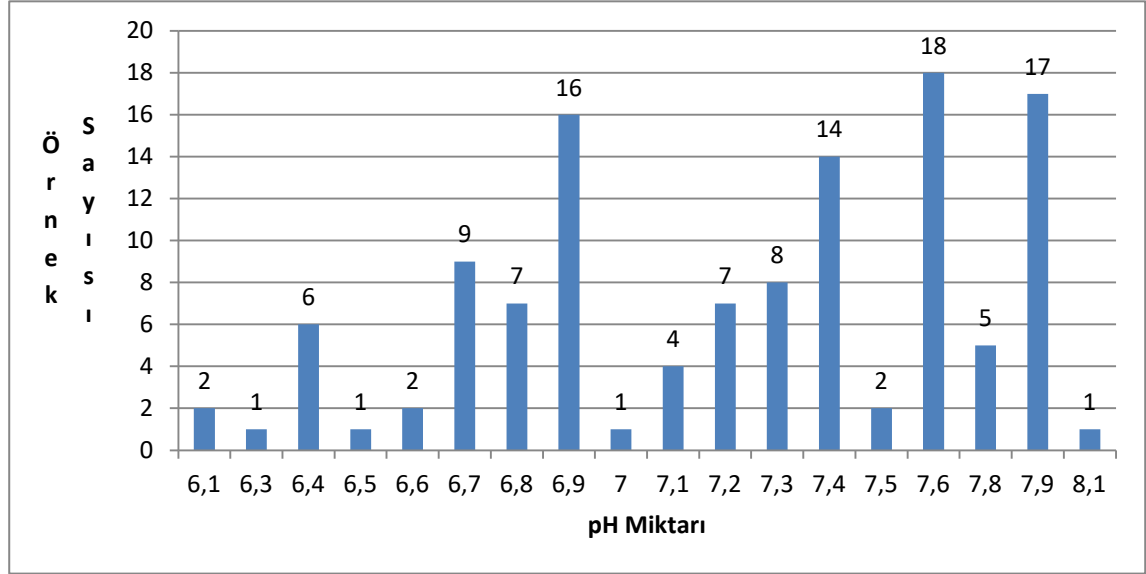
Örnek No	Ph	Sıcaklık (°c)	Serbest Klor Miktarı	
			ppm	mg/L
41. ÖRNEK	6,9	4,7	<0,3	<0,15
42. ÖRNEK	7,4	6,3	<0,3	<0,15
43. ÖRNEK	6,7	4,3	<0,3	<0,15
44. ÖRNEK	7,2	5,7	<0,3	<0,15
45. ÖRNEK	6,9	4,6	<0,3	<0,15
46. ÖRNEK	7,3	6,4	<0,3	<0,15
47. ÖRNEK	7,4	5,7	<0,3	<0,15
48. ÖRNEK	6,4	6,1	<0,3	<0,15
49. ÖRNEK	7,2	7,4	<0,3	<0,15
50. ÖRNEK	6,9	5,6	<0,3	<0,15
51. ÖRNEK	6,7	5,4	<0,3	<0,15
52. ÖRNEK	7,4	6,4	<0,3	<0,15
53. ÖRNEK	7,1	6,1	<0,3	<0,15
54. ÖRNEK	6,4	5,9	<0,3	<0,15
55. ÖRNEK	6,9	4,6	<0,3	<0,15
56. ÖRNEK	6,7	5,0	<0,3	<0,15
57. ÖRNEK	7,2	6,4	<0,3	<0,15
58. ÖRNEK	7,1	7,7	<0,3	<0,15
59. ÖRNEK	6,7	5,1	<0,3	<0,15
60. ÖRNEK	7,6	6,1	<0,3	<0,15
61. ÖRNEK	7,3	6,4	<0,3	<0,15
62. ÖRNEK	7,4	7,2	<0,3	<0,15
63. ÖRNEK	6,9	4,3	<0,3	<0,15
64. ÖRNEK	6,9	5,3	<0,3	<0,15
65. ÖRNEK	7,3	6,7	<0,3	<0,15
66. ÖRNEK	7,2	8,1	<0,3	<0,15
67. ÖRNEK	6,7	8,7	0,4	0,15
68. ÖRNEK	6,9	9,2	<0,3	<0,15
69. ÖRNEK	7,2	8,7	<0,3	<0,15
70. ÖRNEK	6,7	8,4	<0,3	<0,15
71. ÖRNEK	7,3	7,6	<0,3	<0,15
72. ÖRNEK	7,9	9,6	<0,3	<0,15
73. ÖRNEK	7,8	5,9	<0,3	<0,15
74. ÖRNEK	7,6	6,7	<0,3	<0,15
75. ÖRNEK	7,9	9,4	<0,3	<0,15
76. ÖRNEK	7,4	7,9	<0,3	<0,15
77. ÖRNEK	7,4	9,6	<0,3	<0,15
78. ÖRNEK	7,6	6,1	<0,3	<0,15
79. ÖRNEK	7,6	7,4	<0,3	<0,15
80. ÖRNEK	7,6	7,6	<0,3	<0,15

Tablo 4. Devamı

Örnek No	Ph	Sıcaklık (°c)	Serbest Klor Miktarı	
			ppm	mg/L
81. ÖRNEK	7,9	6,7	<0,3	<0,15
82. ÖRNEK	7,4	9,7	<0,3	<0,15
83. ÖRNEK	7,9	6,4	<0,3	<0,15
84. ÖRNEK	7,6	6,1	<0,3	<0,15
85. ÖRNEK	7,9	7,1	<0,3	<0,15
86. ÖRNEK	7,8	6,9	<0,3	<0,15
87. ÖRNEK	7,4	9,9	<0,3	<0,15
88. ÖRNEK	6,7	8,9	0,4	0,15
89. ÖRNEK	6,5	6,7	<0,3	<0,15
90. ÖRNEK	6,4	6,1	<0,3	<0,15
91. ÖRNEK	6,9	9,5	<0,3	<0,15
92. ÖRNEK	6,8	7,7	<0,3	<0,15
93. ÖRNEK	6,9	6,7	<0,3	<0,15
94. ÖRNEK	6,4	7,7	0,4	0,15
95. ÖRNEK	6,6	9,6	<0,3	<0,15
96. ÖRNEK	6,8	4,7	<0,3	<0,15
97. ÖRNEK	6,9	6,4	<0,3	<0,15
98. ÖRNEK	6,6	9,7	<0,3	<0,15
99. ÖRNEK	7,6	6,4	<0,3	<0,15
100. ÖRNEK	7,9	7,4	<0,3	<0,15
101. ÖRNEK	7,6	3,4	<0,3	<0,15
102. ÖRNEK	7,6	5,6	<0,3	<0,15
103. ÖRNEK	6,8	8,6	<0,3	<0,15
104. ÖRNEK	6,4	5,3	<0,3	<0,15
105. ÖRNEK	7,2	6,3	<0,3	<0,15
106. ÖRNEK	6,9	5,8	<0,3	<0,15
107. ÖRNEK	7,9	7,9	<0,3	<0,15
108. ÖRNEK	7,6	6,8	<0,3	<0,15
109. ÖRNEK	6,8	4,7	<0,3	<0,15
110. ÖRNEK	7,3	5,9	<0,3	<0,15
111. ÖRNEK	6,9	6,2	<0,3	<0,15
112. ÖRNEK	7,0	3,7	<0,3	<0,15
113. ÖRNEK	7,6	5,6	<0,3	<0,15
114. ÖRNEK	6,8	4,9	<0,3	<0,15
115. ÖRNEK	7,5	5,6	<0,3	<0,15
116. ÖRNEK	6,9	9,8	<0,3	<0,15
117. ÖRNEK	7,3	8,6	<0,3	<0,15
118. ÖRNEK	6,8	7,9	<0,3	<0,15
119. ÖRNEK	7,6	9,1	<0,3	<0,15
120. ÖRNEK	7,4	8,7	<0,3	<0,15

Çalışmaya alınan örneklerden 75 tanesinin pH değeri 7.1 - 8.1, 44 tanesinin ise pH'sı 6.0 - 6.9 arasında ölçülmüştür. Sadece 1(bir) örneğin pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir. Örneklerin pH değerlerine göre dağılımı Grafik 4'de gösterilmiştir.

Grafik 2. Örneklerin pH değerleri gösterilmektedir.



Örneklerden sekiz tanesinde klor miktarı 0.3 ppm'den yüksek bulunmuştur. Bu sekiz örnekten yedi tanesinde klor miktarı 0.4 ppm, bir tanesinde ise 0.5 ppm olarak ölçülmüştür. Kalan 112 örnekte ise klor miktarı 0.3 ppm'den düşük olarak belirlenmiştir. Örneklerin klor miktarına göre dağılımı Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Örneklerin klor miktarına göre dağılımı.

	Klor miktarı		
	<0.3 ppm	0.4 ppm	0.5 ppm
Örnek sayısı	112	7	1

Çalışmamızda saptadığımız NTM kökenlerinin izole edildiği su örneklerinin pH, sıcaklık ve klor miktarları incelenmiş ve tablo 6'da gösterilmiştir. İzole ettiğimiz NTM

türlerinin bulunduğu su örneklerindeki klor miktarlarına bakıldığında sadece iki örneğin klor miktarı 0.3ppm'den yüksek (0.4 ppm) çıkmıştır.

Tablo 6. Su örneklerinden izole edilen NTM türleri, pH, sıcaklık ve klor miktarları

Örnek no	NTM türü	pH	Sıcaklık (°C)	Serbest klor miktarı	
				ppm	mg/L
2.örnek	<i>M.fortuitum</i>	7,3	10,6	<0,3	<0,15
5.örnek	<i>M.fortuitum</i>	6,1	9,6	<0,3	<0,15
6.örnek	<i>M.fortuitum</i>	6,9	10,9	<0,3	<0,15
9.örnek	<i>M.chelonae</i>	7,8	5,6	<0,3	<0,15
17.örnek	<i>M.lentifavum</i>	7,9	6,6	0,4	0,15
20.örnek	<i>M.fortuitum</i>	7,8	9,7	<0,3	<0,15
21.örnek	<i>M.lentifavum</i>	7,9	6,7	<0,3	<0,15
22.örnek	<i>M.peregrinum</i>	8,1	7,7	<0,3	<0,15
24.örnek	<i>M.fortuitum</i>	6,9	7,5	<0,3	<0,15
29.örnek	<i>M.fortuitum</i>	7,4	5,6	<0,3	<0,15
31.örnek	<i>M.gordonae</i>	7,6	7,2	<0,3	<0,15
34.örnek	<i>M.fortuitum</i>	6,8	7,7	<0,3	<0,15
44.örnek	<i>M.fortuitum</i>	7,2	5,7	<0,3	<0,15
67.örnek	<i>M.fortuitum</i>	6,7	8,7	0,4	0,15
59.örnek	<i>M.szulgai</i>	6,7	5,1	<0,3	<0,15
70.örnek	<i>M.szulgai</i>	6,7	8,4	<0,3	<0,15
78.örnek	<i>M.gordonae</i>	7,6	6,1	<0,3	<0,15
84.örnek	<i>M.szulgai</i>	7,6	6,1	<0,3	<0,15
39.örnek	<i>M.chelonae</i>	7,9	6,3	<0,3	<0,15
99.örnek	<i>M.gordonae</i>	7,6	6,4	<0,3	<0,15

İzole ettiğimiz NTM türlerinin alındığı su örneklerinin pH, sıcaklık ve klor miktarlarına göre dağılımı incelendiğinde aralarında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Klor miktarı yüksek olan su örneklerinde de NTM izolasyonu saptanmıştır.

Çalışmaya alınan su 120 örneğinden toplam 20 (%16.6) örnekte NTM kökeni izole edilmiştir. Ekim yapılan besiyerlerinden, MGIT besiyerinde bir, LJ ve Middlebrook besiyerinde ikişer adet kontaminasyon gözlenmiştir. Kontaminasyon gözlenen bu

örneklerin diğer besiyerlerindeki kültürlerinde kontaminasyon görülmemiş ve NTM izolasyonu sağlanmıştır. Bir numunede ise sadece LJ besiyerinde üreme olmuş, MGIT ve Middlebrok 7H11 besiyerleri kontamine olmuştur. Bu izolat G+C oranı yüksek Gram pozitif bakteri olarak tanımlanmış ancak isimlendirilememiştir. MGIT besiyerinde pozitif sinyal veren örneklerden 7 tanesinin ilk üremesinden yapılan ARB sonuçlarında ARB pozitif basillerle birlikte kontaminant mikroorganizmalarda görülmüştür. Bu besiyerleri tekrar dekontamine edilerek yeni besiyerlerine ekimleri yapılmış, sonrasında oluşan üremelerden yapılan ARB sonuçlarında sadece ARB pozitif basiller görülmüştür. Bu sadeleştirme işleminin öncesinde basillerin ölme riskine karşı olarak da dekontaminasyon öncesi pozitif örnekler pasajlanmışlardır.

NTM izole ettiğimiz 20 su örneğinden 10 tanesi kurum, 10 tanesi mesken suyundan alınmıştır. Kurum sularından 5 tanesi depo, 5 tanesi şebeke sularından alınmıştır. Kalan 10 su örneği ise mesken suyu olup tamamı şebeke sularından alınmış örneklerdir. Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. NTM üremesi saptanan su örneklerin kaynağına göre dağılımı

	Kurum Suyu	Mesken Suyu	Toplam
Depo Suyu	5	-	5
Şebeke Suyu	5	10	15
Toplam	10	10	20

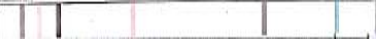
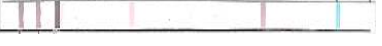
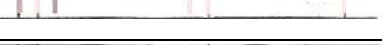
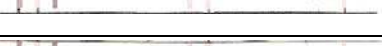
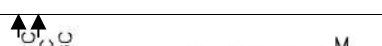
Üreme saptanan NTM türlerinin, üredikleri besiyerleri ve isimleri tablo 8’de gösterilmiştir. Tabloda görülen kontaminasyonlar sadece o besiyeri için geçerli olup, diğer besiyerlerinde kontaminasyon gerçekleşmemiş, kontamine olmamış besiyerlerinden izolasyon ve identifikasyon yapılmıştır.

Tablo 8. İzole edilen NTM kökenlerinin üreme saptanan besiyerlerine göre dağılımı

Bakteri Türü	LJ	MB	MGIT
<i>M.fortuitum</i>	+	+	+
<i>M.fortuitum</i>	+	+	+
<i>M.fortuitum</i>	+	Kontamine	+
<i>M.chelonae</i>	+	+	+
<i>M.lentifavum</i>	+	+	+
<i>M.fortuitum</i>	+	Kontamine	+
<i>M.lentifavum</i>	+	+	+
<i>M.peregrinum</i>	+	+	+
<i>M.fortuitum</i>	Kontamine	+	+
<i>M.fortuitum</i>	+	+	Kontamine
<i>M.gordonae</i>	+	+	+
<i>M.fortuitum</i>	+	+	+
<i>M.fortuitum</i>	+	+	+
<i>M.fortuitum</i>	Kontamine	+	+
<i>M.szulgai</i>	+	+	+
<i>M.chelonae</i>	+	+	+
<i>M.szulgai</i>	+	+	+
<i>M.gordonae</i>	+	+	+
<i>M.szulgai</i>	+	+	+
<i>M.gordonae</i>	+	+	+
Gram pozitif basil (G+C oranı yüksek)	+	Kontamine	Kontamine

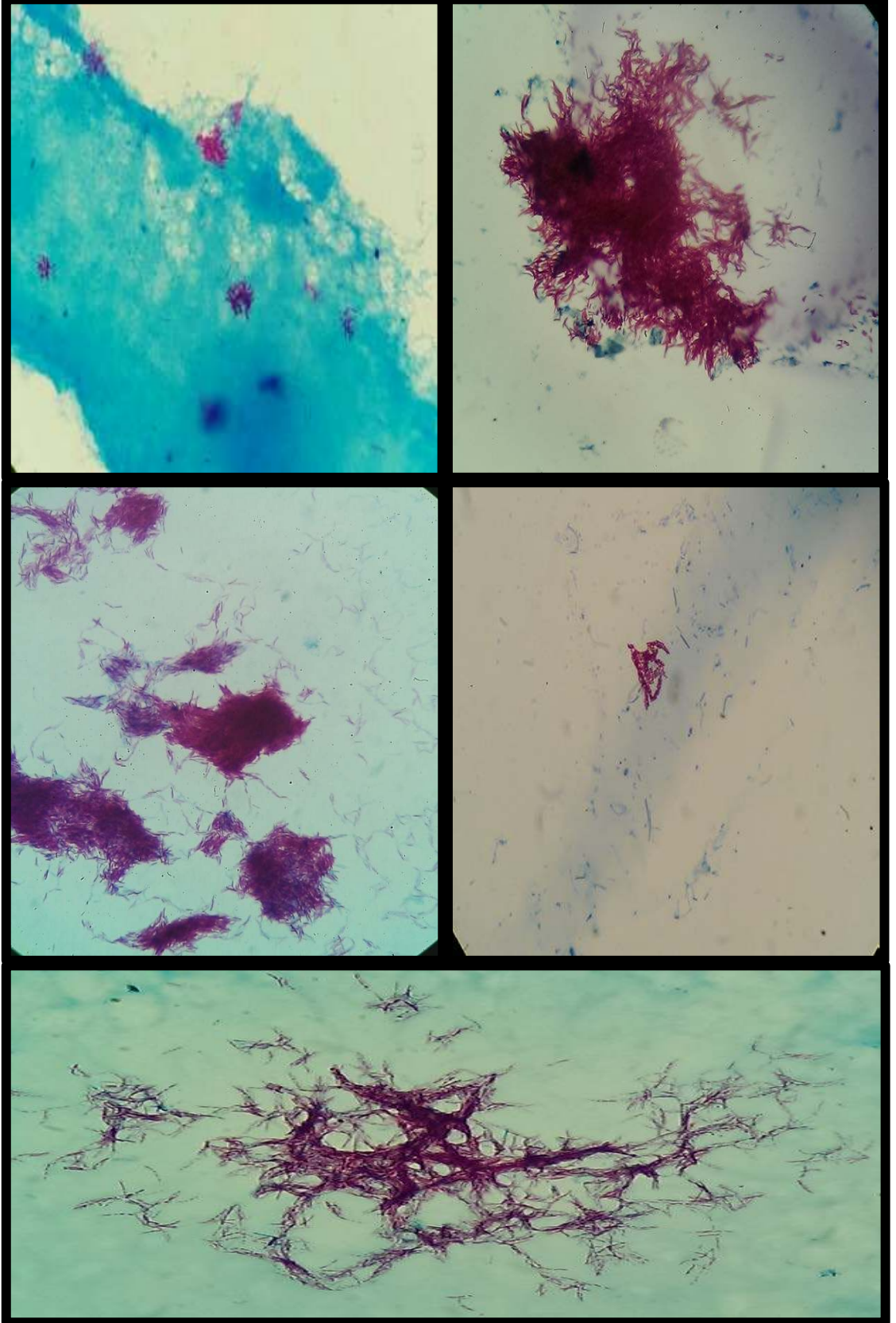
Çalışmamızda izole edilen mikroorganizmalar moleküler yöntemlerle tanımlanmış ve identifikasyon sonuçları Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Hibridizasyon çalışma sonuçlarımızın CM ve AS stripleri ile gösterilmesi.

İdentifikasyon Sonucu	
<i>M.fortuitum</i> (CM)	
<i>M.fortuitum</i> (CM)	
<i>M.fortuitum</i> (CM)	
<i>M.fortuitum</i> (CM)	
<i>M.fortuitum</i> (CM)	
<i>M.fortuitum</i> (CM)	
<i>M.fortuitum</i> (CM)	
<i>M.fortuitum</i> (CM)	
<i>M.fortuitum</i> (CM)	
<i>M.gordoniae</i> (CM)	
<i>M.gordoniae</i> (CM)	
<i>M.gordoniae</i> (CM)	
<i>M.chelonae</i> (CM)	
<i>M.chelonae</i> (CM)	
<i>M.peregrinum</i> (CM)	
<i>M.szulgai</i> (CM)	
<i>M.szulgai</i> (CM)	
<i>M.szulgai</i> (CM)	
<i>M.lentiflavum</i> (AS)	
<i>M.lentiflavum</i> (AS)	
İdentifikasyon sonucu	

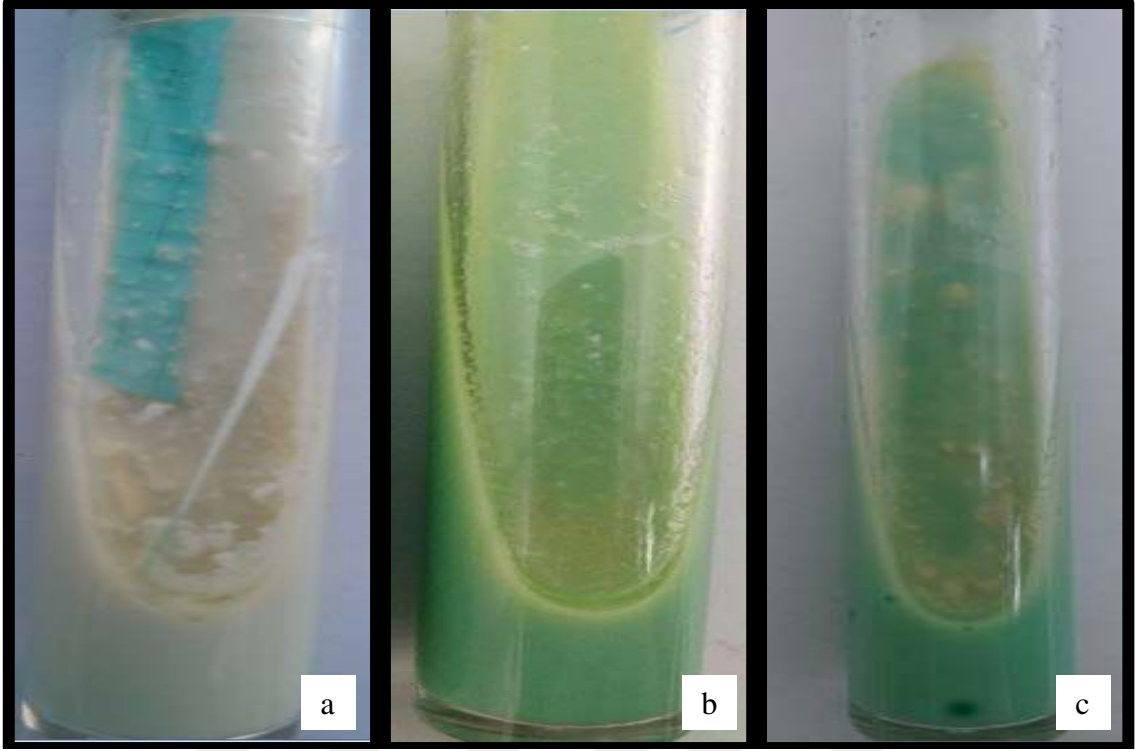
Araştırmamızda izole edilen NTM türlerinin ARB boyama sonuçları Resim 1’de gösterilmiştir.

Resim 1. Mikroorganizmaların besiyerlerinden yapılan EZN boyama ile görünömleri



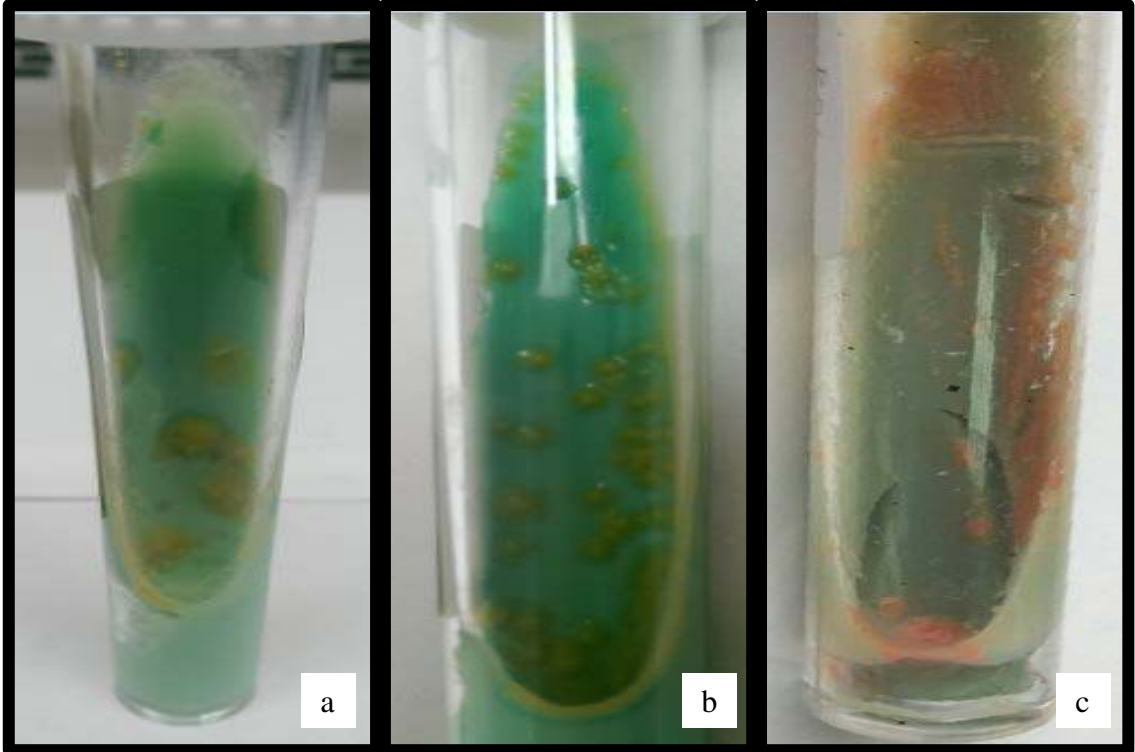
Hızlı üreyen NTM türlerinin LJ besiyerindeki üremesi Resim 2’de gösterilmiştir.

Resim 2. a)*M.fortuitum* b)*M.chelonae* c)*M.peregrinum* kolonileri



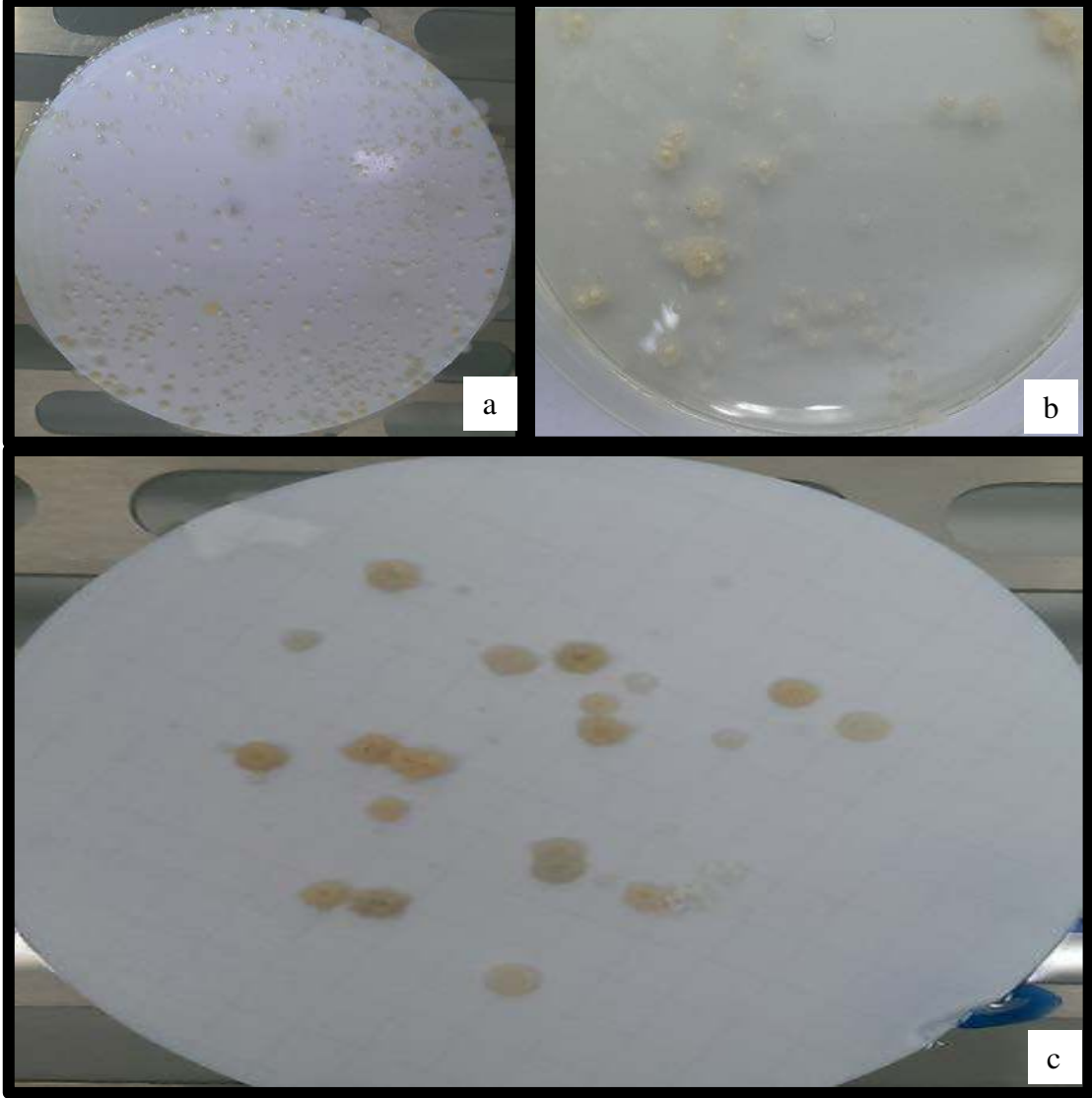
Yavaş üreyenler NTM türleri grubundan skotokromojenler Resim 3’de gösterilmiştir.

Resim 3. a) *M.lentiflavum* b) *M.gordonae* c) *M.szugai* kolonileri gösterilmiştir.



Hızlı üreyen NTM türlerinin Middlebrook besiyerinde üremesi Resim 4’de gösterilmiştir.

Resim 4. a) *M.fortuitum* b) *M.chelonae* c) *M.peregrinum*



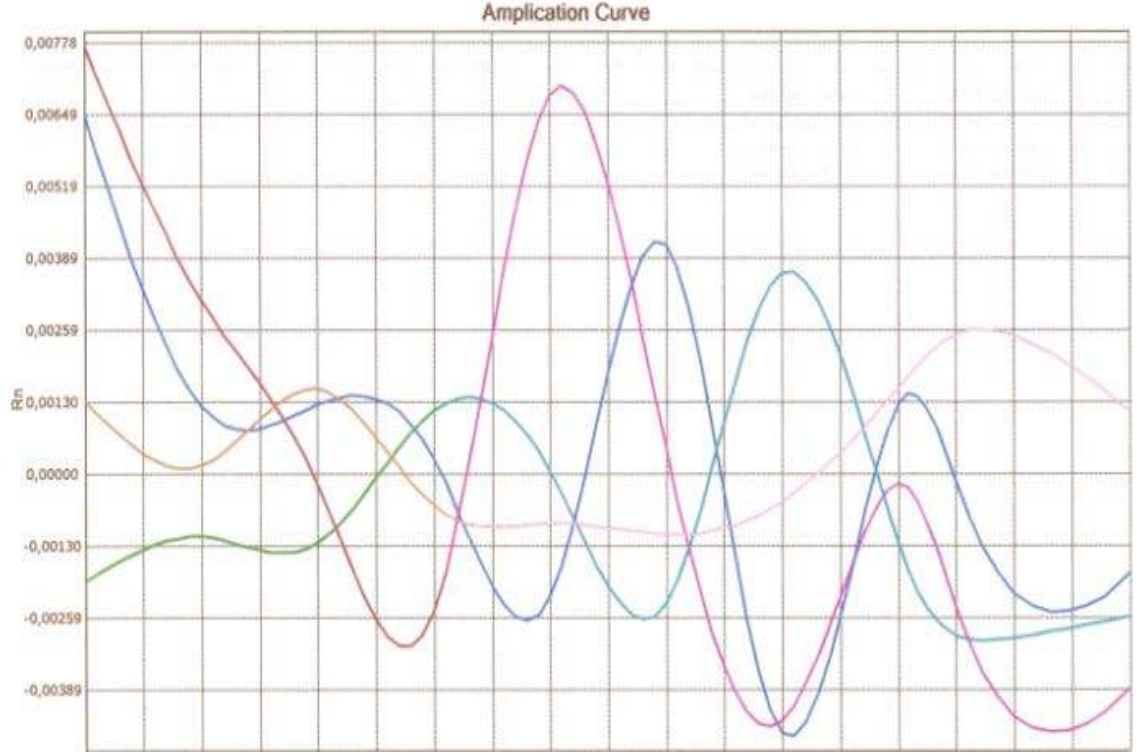
Yavaş üreyen NTM türleri Middlebrook besiyerinde üremesi Resim 5’de gösterilmiştir.

Resim 5. a) *M.lentiflavum* b) *N.gordonae* c) *M.szulgai*



Resim 6’da besiyerlerinde üremesi olan NTM kökenlerinin gen ekstrasyonu sonrası PCR cihazı ile yapılan gen amplifikasyon sonucuna bir örnek olarak gösterilmiştir.

Resim 6. NTM kökenlerinin gen ekstrasyonu sonucu oluşan amplifikasyon grafiği



5.TARTIŞMA

Musluk suyundan kaynaklanan non tüberküloz mikobakteriler insan vücudunda kolonizasyon ve/veya enfeksiyonlara yol açtığını bildiren çok sayıda çalışma vardır^{82,87,88}. Bu mikroorganizmalar AIDS'li hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır⁸⁷. NTM'lerin klinik ve cerrahi alanda kontaminant olarak bulunmakta ve bu sebeple enfeksiyonlardan sorumlu oldukları bildirilmiştir. Yine bu mikroorganizmalar kontamine solusyonların enjeksiyonu sonucu gelişen lokal ve yaygın hastalık oluşturabilmektedirler⁸⁹.

NTM'ler içme ve kullanma sularında bulunma sıklığı farklı çalışmalarda değişik oranlarda bildirilmektedir. Araştırma sonuçlarına göre izole edilen NTM oranlarındaki farklılık, izolasyon yöntemlerinin farklı olmasına ve örneklerin alındığı kaynakların değişkenlik göstermesine bağlanmaktadır^{19,26,78,83,90,95,98,99}. Çalışmamızda toplam 120 adet su örneği mikrobiyolojik kültür ve moleküler yöntem ile değerlendirilmiş, örneklerin 20 tanesinde (%16.6) NTM varlığı moleküler yöntemle tespit edilmiştir. Bu örnekler 9 (dokuz) adet *M.fortuitum*, 3 (üç) adet *M.gordonae*, 3 (üç) adet *M.szulgai*, 2 (iki) adet *M.lentiflavum*, iki (iki) adet *M.chelonae*, 1(bir) adet *M.pregrinum*, olarak tanımlanmıştır.

Yurt dışında yapılan çalışmalar arasında, Hussein ve ark Almanyada farklı hastanelerin sularından topladıkları 93 su örneğinden 53 tanesinde (%56,9) NTM saptamışlardır⁸³. Adı geçen çalışmada sık izole edilen NTM türler arasında *M.xenopi*, *M. gordonae* ve *M.flavescens* olarak bildirmişlerdir. Fox ve ark İngilterede yaptıkları çalışmada 40 adet hastane musluk suyundan, 14 adet (%35) NTM izole etmişler, en sık izole edilen tür olarak *M.kansasii* ve *M.gordonae* saptamışlardır⁹⁰. Bu iki çalışmada en sık izole edilen köken olarak *M.gordonae* belirlemişlerdir. Çalışmamızda *M.gordonae* izole ettiğimiz NTM türleri arasında en sık izole edilen ikinci tür olarak saptanmıştır. Sebakova ve ark Çek Cumhuriyet'inde farklı iki sağlık kurumundan aldıkları 120 adet sıcak su örneğinden 56 tanesinde (%46,7) NTM izole etmiş ve bunlardan *M.gordonae* ve *M.kansasii* türlerini en sık izole edilen türler arasında göstermişlerdir⁸⁰. Chilima ve ark tarafınan yapılan çalışmada ise toplam 24 adet içme suyu incelenmiş ve bunlardan 18 tanesinde kültürde (%75) üreme saptanmış olmasına rağmen 13 tanesinde (%54)

moleüler olarak NTM pozitiflik saptanabilmiştir⁹¹. Bu çalışmada sıklıkla *M.bovis* ve *M.patafortuitum* izole edildiği bildirilmiştir. Yine yurt dışında yapılan bazı çalışmalarda ise bizim çalışmamıza yakın oranlarda NTM izole edilmiştir^{92,93,94,96}. Vantarakis ve ark tarafından Yunanistan'ın beş farklı bölgesindeki hastanelerden alınan 64 su örneğinden 10 tanesinde (%15,6) NTM izole edilmiştir. Bu çalışmada da en sık izole edilen NTM türleri *M.chelonae* ve *M.gordonae* olarak bildirilmiştir⁹². Narang ve ark tarafından Hindistan'da içme sularında yapılan bir çalışmada, 5 (beş) adet NTM (%15) kökeni izole edilmiş ve bunlar *M.fortuitum*(3), *M.abscesus*(1), *M.flavescens*(1) türleri olarak bildirilmiştir⁸⁸. Gruft ve ark tarafından yapılan bir başka çalışmada ise toplam 520 adet su örneğinden 128 (%24,6) tanesinde NTM izole edilmiştir. Bu çalışmada izole sık edilen NTM'l türleri olarak *M.fortuitum* - *chelonae* complex, *M.gordonae* ve *M.terrae* bildirilmiştir⁹³. Chang ve ark tarafından Çin'deki bir hastaneden alınan 49 musluk suyu örneğinin 10'unda (%20,4) NTM izole edilmiştir. En çok izole edilen NTM kökenleri *M.gordonae*, *M.fortuitum* ve *M.scrofulaceum* türleridir⁹⁴. Conger ve ark ABD'de *M.simiae* araştırdıkları çalışmalarında, bir hastanenin farklı bölgelerinden aldıkları 71 su örneğinden 12 tanesinden *M.simiae* (%16,9) saptamışlardır⁹⁵. Rahbar ve ark tarafından yapılan ve toplam 120 su örneğinin incelendiği çalışmada ise 10 adet (%8,3) NTM kökeni izole edilmiştir. İzole edilen NTM türleri arasında *M.fortuitum*, *M.chelonae* ve *M.peregrinum* türlerinin bildirilmiştir⁹⁶. Marshall ve ark *M. lentiflavum* izolatlarının klinik önemini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada 206 içme suyundan 13'ünden *M.lentiklavum* izole edilmiştir⁹⁷.

Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Akbal H tarafından İstanbul da farklı bölgelerdeki şebeke, depo ve kaynak sularında NTM'araştırdıkları çalışmalarında, 500 adet su örneğinde incelenmiş ve NTM izole edilen 33 örneğin (%6,6) tamamının *M.gordonae* olduğu bildirilmiştir⁹⁸. Mersin ilinde Cafri ve ark tarafından yapılan çalışmada ise hastane suyu, kaynak ve şebekelerden alınan toplam 101 su örneği incelenmiş ve bunlardan 5 (%4,9) tanesinde NTM izole edilmiştir. İzole edilen türlerin *M.chelonae* ve *M.kansasii* olarak bildirilmiştir⁷⁷. Erköse Genç G tarafından yine İstanbul iki farklı hastanenin depo, duş ve musluk sularından alınan 160 su örneği incelenmiştir. Bu örneklerden 33 (%20,6) tanesinde NTM izole edilmiştir. İzolatların *M.lentiflavum*, *M.gordonae* ve *M.peregrinum* olarak tanımlanmıştır⁹⁸. Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada Baş B tarafından Muğla- Bodrum ilçesinde toplam 43 tatlı su örneğinde NTM varlığı incelenmiş ve 3 (üç) (%7) köken izole

edilmiştir. İzole edilen türler *M.fortuitum*, *M.marinium* ve *M.chelonae* olarak identifiye edilmiştir²⁶.

Hem yurt içinde hem yurt dışında yapılan çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, izolasyon oranlarında farklılık olmasına rağmen, rakamlar birbirine yakın olarak değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamız literatürdeki çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde bir kısmına benzer oranlar bulunmuştur. Bazı çalışmalarla ise oranların farklı olduğu görülmüştür. NTM izolasyon oranındaki bu farklılığının örnek sayılarının farklı olması, çalışmanın yapıldığı bölgenin epidemiyolojik özellikleri, suların kullanım politikaları ve örnek alma mevsimine bağlı olabileceğini düşündürmüştür. İzole edilen kökenler değerlendirildiğinde ise literatürdeki çalışmalara benzer şekilde hemen hemen aynı tür NTM kökenlerin tarafımızdanda identifiye edildiği görülmüştür.

Ülkemizde ve yurt dışında yapılan NTM araştırmaları incelendiğinde, çalışmalarda kullanılan su miktarlarının 50-3000 ml arasında olduğu bildirilmektedir^{94,95,100}. Yapılan bir çalışmada kullanılan su miktarının izolasyon oranını etkilediği bildirilmiştir¹⁰⁰. Çalışmalarda kullanılan su miktarları karşılaştırıldığında; Erköse Genç G çalışmasında her kaynaktan 3000 ml'lik su örneği toplanmış ve her bir besiyerine 500 ml'lik suyun süzülmesi filtreler yerleştirilerek NTM izolasyonu yapılmıştır⁹⁹. Adı geçen çalışmada izolasyon oranı %20.6 olarak saptanmıştır. Ülkemizde yapılan ve çalışmamızdan daha az miktarda su örneği kullanılan Akbal H⁹⁸ ve Cafri ve ark⁷⁸ araştırmalarında 1000 ml'lik su örneklerini filtreden geçirip ekim yapmışlardır. Ekim sonucu NTM izolasyon oranını sırasıyla % 6.6 ve %4.9 olarak saptamışlardır. 1000 ml'lik su örneklerinden filtrasyon yöntemiyle ekim yapılan diğer bir çalışmada Sebakova ve ark izolasyon oranları %46, 7 olarak bildirmişlerdir⁸⁰. Diğer bir çalışmada ise Hussein ve ark ise 500 ml'lik suların süzülmesi filtrelerden ekim yapmış ve izolasyon oranlarını % 56,9 olarak bildirmişlerdir⁸³. Chang ve ark⁹⁴ ile Vantarakis ve ark⁹²'nin yapmış oldukları çalışmalarda 200 ml'lik su örnekleri kullanmışlar ve izolasyon oranları sırasıyla %20.4 ve %15.6 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki saptadığımız oranlar literatürdeki çalışmalarla benzer olarak kabul edilmiştir. Yine Fox ve ark 400 ml'lik örnekleri filtrasyon yapmışlar ve bu çalışmanın izolasyon oranını %35 olarak saptamışlardır⁹⁰. Çalışmamızda 2000 ml su kullanılarak izolasyon yapılmış ve izolasyon oranı % 16.6 olarak tesbit edilmiştir. Her ne kadar çalışmalarda kullanılan su miktarının NTM izolasyonunu etkilediğini bildiren çalışma olsada¹⁰⁰ çalışmamız yukarıda adı geçen

diğer çalışmalarla^{78,80,94,98,99} birlikte değerlendirildiğinde su miktarının NTM izolasyon oranlarını etkilemediğini düşündürmektedir.

Yapılan bir çalışmada ise izole edilen NTM oranı ile çalışmada kullanılan suyun alındığı yer, pH, sıcaklığı ve izolasyon yöntemlerinin ilişkili olduğu bildirilmiştir¹⁰⁰. Çalışmamızda NTM izole edilmiş su örneklerinin ölçülen sıcaklık, pH ve serbest klor konsantrasyon değerleri incelenmiş, NTM izolasyonu ile ölçülen sıcaklık ($p=0,418$), pH ($p=0,417$) ve serbest klor konsantrasyon ($p=0,619$) arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Araştırmamızda her kaynaktan 2000 ml olarak alınan örnekler, birer litrelik steril kaplara konulmuş, %4'lük NaOH ile dekontamine edilmiştir. Dekontaminasyon sonrasında yoğunlaştırmak için filtrasyon yöntemi kullanılmış ve 1000 ml'lik suyun süzüldüğü filtre MGIT besiyerine yerleştirilmiş, kalan 1000 ml'lik suyun süzüldüğü filtreler ise ikiye bölünerek LJ ve Middlebrook 7H11 besiyerlerine yerleştirilmiştir.

NTM izolasyonu için toplanan su örnekleri üzerine yapılan çalışmaların bazılarında, sudaki kloru nötralize etmek için sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) kullanılmıştır^{78,98}. Bu bileşik suda bulunan klor ile etkileşime girerek sülfür, sülfür dioksit ve su açığa çıkarmaktadır. Yapılan bir çalışmada suda bulunan artık klorun nötralize edilmesiyle bakterilerin üremesinin arttırdığı yada klorun nötralize edilmediği durumlarda NTM izolasyonunu azalttığı yönünde herhangi bir bulgu saptanmamıştır¹⁰⁰. Adı geçen çalışmada Thomson ve ark sadece kloru nötralize ederek yapılan izolasyonlarda NTM koloni sayılarında düşüş olduğunu ancak bunun anlamlı olmadığını bildirmiştir¹⁰⁰. Bu sebeple NTM'lerin çoğunun klora göreceli olarak direnç gösterdiği ve bu kimyasalın NTM izolasyonunda kullanmaya gereksinim olmadığını bildirmişlerdir¹⁰⁰. Ülkemizde Erköse Genç G⁹⁹ ve Cafri ve ark⁷⁸ ile Akbal H⁹⁸ tarafından yapılan NTM izolasyon çalışmalarında bu madde kullanılmıştır ve izolasyon oranları sırasıyla %20.6, %4.9 ve %6.6 olarak saptanmış ve izolasyon oranında bir değişiklik bildirilmemiştir. Yine bu maddeyi kullanarak NTM izolasyonu yapan Vantarakis ve ark %15.6 oranında izolasyon saptamışlar ve bu maddenin izolasyon oranında değişiklik yapıp yapmadığı hususunda bildirimde bulunmamışlardır⁹². Yapılan bazı çalışmalarda ise bu kimyasal kullanılmadan NTM izolasyonu yapılmıştır^{80,83,90}. Çalışmamız başlangıcında toplanan su örneklerinden izolasyon aşamasından önce, serbest klor miktarının ölçümü O-toluidin ayırıcı ve klor stribi ile yapılmıştır. Örneklerimiz içinde sadece 8 (sekiz) örnek klor miktarı bakımından yüksek bulunmuş ve sadece bu 8 (sekiz) örneğe klor

nötralizasyonu için sodyum tiyosülfat eklenmiştir. Geride kalan örnekler için sodyum tiyosülfat kullanılmamıştır. Çalışmamızda izole ettiğimiz NTM kökenlerinin bulunduğu suların klor miktarlarına bakıldığında sadece iki su örneğinin yüksek düzeyde (0.4ppm-0.15mg/L) klor içerdiği, diğer örneklerinse klor seviyesinin 0.3 ppm'den düşük olduğu görülmüştür. Bu durum, Thomson ve ark¹⁰⁰ yaptığı çalışmada belirttikleri gibi NTM türlerinin klora karşı dirençli olabileceğini göstermiştir.

Su örneklerinde bulunan NTM'lerin izolasyonu için yapılan çalışmaların bir çoğunda yoğunlaştırma işlemi öncesinde dekontaminasyon işlemi yapılmıştır^{26,52,78,98,99,101}. Dekontaminasyon maddesinin yapısı, oranı ve uygulamadaki geçen süre oldukça önemlidir. Çalışmalarda dekontaminasyon için en çok kullanılan maddeler setilprinidyum klorid ve sodyum hidroksit olduğu bildirilmiştir¹⁰¹. Ülkemizde yapılan çalışmalardan; Cafri ve ark⁷⁸, Akbal H⁹⁸ ve Baş B²⁶'nin sulardan NTM izolasyonunda bizim çalışmamızda kullandığımız aynı dekontaminasyon maddesi (%4'lük NaOH)'ni kullanmış, Erköse Genç G'in ise yapmış olduğu çalışmada ise, dekontaminasyon için %0.005'lik setilprinidyum klorid kullanmıştır⁹⁹. Shin ve ark ise yaptıkları çalışmada örnekleri %1'lik NaOH ile dekontamine etmişlerdir⁵². Adı geçen çalışmada NTM izolasyonu oranını %50 olarak saptamış ve %6 kontaminasyon oranı bildirilmiştir. Gruft ve ark⁹³ ile Marshall ve ark⁹⁷ tarafından yapılan çalışmada dekontaminasyon için %2-4 NaOH kullanmışlardır. Bu çalışmalardan farklı olarak örneklerin dekontaminasyon işlemine tabi tutmadan NTM izolasyonu yapılan çalışmalarda bulunmaktadır^{52,94}. Yapmış olduğumuz çalışmada her kaynaktan 2000 ml örnek alınarak birer litrelik steril kaplara konulmuş, bunlardan ilk 20 tanesi birer litre halinde ikiye ayrılmış, %0.005'lik setilprinidyum klorid ve %2'lik NaOH ile ayrı ayrı dekontamine edildikten sonra besiyerlerin ekimleri yapılmıştır. Fakat ekimi yapılan besiyerlerlerinde kontaminasyon miktarının fazla olması (LJ besiyerinde 13/20, middlebrook için 17/20, MGİT için 14/20) sebebiyle kullanılan bu iki dekontaminat maddeden vazgeçilerek örnekler tekrar %4'lük NaOH ile dekontamine edilmiştir. Bu şekilde yapılan dekontaminasyonda besiyerlerindeki kontaminasyon miktarı düşmüştür (LJ ve Middlebrook için 4/120, MGİT için 8/120) . Bu sonuç bize dekontaminasyon işlemi için %4 NaOH kullanımının kontaminasyon oranını düşürdüğü ve bu kimyasal maddenin kullanımının dekontaminasyon için daha uygun olduğunu düşündürmüştür.

Literatürdeki çalışmalar değerlendirildiğinde su örneklerinin yoğunlaştırılması için iki farklı yöntem öne çıkmaktadır. Bunlardan bir tanesi çalışmamızda kullanmış

olduğumuz filtrasyon yöntemi ile yoğunlaştırma yapılması^{83,90,92,98,99}, diğeri ise santrifüj ile yapılan yoğunlaştırmadır^{26,52}. Çalışmamızda filtrasyon sonrası, filtrenin besiyerine yerleştirilerek yapılan ekim yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemi Gonca Erköse G, Vantarakis ve ark ile Hussein ve ark'da bizim çalışmamızla aynı şekilde kullanmışlardır^{83,92,99}. Filtrenin steril bir suda parçalayarak süspanse edilmsi ve bu sıvıdan besi yerlerine ekim yapılması da filtrasyon sonrası kullanılan farklı bir yöntemdir^{80,89,98}. Baş B tarafından yapılan çalışmada ise filtrasyon ve santrifüj birlikte kullanılmıştır. Örnekler dekontamine edilmeden önce düşük devirde santrifüj edilmiş, sonrasında tekrar filtreden geçirilmiştir. Daha sonra filtre alınarak % 4'lük NaOH ve steril kum ile parçalanmış, ardından tekrar yüksek hızda santrifüj edilerek alt kısımdaki sediment, besi yerlerine ekilmiştir²⁶. Adı geçen açılışlarda, ekim yöntemlerinin izolasyonu etkileyip etkilemediği bildirilmemiştir^{26,52,80,89,99}. Thomson ve ark tarafından yapılan çalışmada, filtre edilmiş örneklerin izolasyon oranı ile santrifüj edilmiş örneklerin izolasyon oranları karşılaştırılmış, filtre edilmiş örneklerde izolasyon oranı %83,3, santrifüj edilen örneklerin izolasyon oranı %12,1 saptanmış ve adı geçen çalışmada NTM izolasyonu için filtrasyon yönteminin daha etkili olduğu bildirilmiştir¹⁰⁰. NTM türlerinin izolasyonunda, kullanılan besi yerlerinden yumurta temelli besiyeri LJ ve agar temelli ve OADC ilave edilmiş Middlebrook besi yerinin birlikte kullanılması önerilmektedir⁷⁹. Thomson ve ark NTM izolasyonu bakımından LJ ve MB besiyerlerini karşılaştırdıkları çalışmada aralarında ayırt edici herhangi bir farkın olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmalarında ilk haftada MB besiyerinin daha duyarlı olduğu gözlenmiş devam eden üç hafta sonunda ise LJ besiyerinde de üremenin olduğu ve MB ile aralarında bir fark olmadığını gözlemlemişlerdir¹⁰⁰. Peters ve ark tarafından besiyerlerini ve kullanılan dekontaminasyon yöntemlerini karşılaştırmak için yapılan çalışmada, NTM suşları süspansiyon halinde kullanılarak LJ ve MB besiyerlerine ekim yapılmıştır. LJ besiyerinde 16 suşun üremesi gözlenirken, MB besiyerinde ise 10 suşun üremesi gözlenmiş ve LJ besiyerini NTM üremesi açısından MB'a göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir¹⁰².

Thomson ve ark ile Marshall ve ark NTM izolasyon çalışmasında, LJ ve MB besiyerlerine ilave olarak MGIT besiyerinde üçüncü besiyeri olarak kullanılmıştır^{97,100}. Çalışmamızda LJ, MB ve MGIT besiyerleri birlikte kullanılmıştır. İzole ettiğimiz NTM türlerinden identifiye edilen *M.fortitum*, *M.peregrinum* ve *M.chelonae* kökeni, LJ, MB ve MGİT besiyerinde 3-10 günde, Middlebrook besiyerinde 7-15 günde ve LJ

besiyerinde 2-3 haftada üremiştir. Diğer kökenler (*M.szulgai*, *M.lentiflavum* ve *M.gordonae*) her üç besiyerinde on gün –beş hafta arasında üremişlerdir. Ekimi yapılan besiyerlerinden, LJ besiyerinde iki adet ve Middlebrook besiyerinde iki adet kontaminasyon gözlenmiştir. Kontaminasyon gözlenen bu örneklerin diğer besiyerlerinde kontaminasyon görülmemiş ve NTM izolasyonu sağlanmıştır. Sadece bir numunede LJ besiyerinde besiyerinde üreme olmuş, MGIT ve Middlebrook 7H11 besiyerleri kontamine olmuştur. LJ besiyerinde üreyen bu izolat G+C oranı yüksek Gram pozitif bakteri olarak tanımlanmış ancak isimlendirilememiştir. Dolayısıyla besiyerlerinin izolasyon açısından birbirlerine üstünlüğü saptanmamış ve aynı örneğin farklı besiyerlerine ekilmesinin kontaminasyon riski ile birlikte değerlendirildiğinde izolasyon şansını arttırmada avantajlı olduğu düşünülmüştür. Sadece LJ besiyerinde üreyen ve diğer iki besiyerinde üremeyen köken için dekontaminasyon ve izolasyon aşamalarında çalışma hatası olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda, NTM türleri arasında en fazla sayıda izole ettiğimiz, köken *M.fortuitum* (9 adet) olmuştur. Bu tür klinik önemi tespit edilmiş, pigment üretimi olmayan kendine özgü bir fenotipi ve kendine özgü tamamlanmış 16 S sekansı olan NTM kökenidir⁷⁵. *M.fortuitum* kompleks, *M.fortuitum*, *M.peregrinum* tip 1 ve *M.peregrinum* tip 2 olarak üç türü içerdiği bildirilmiştir¹⁰³. Kolonileri yaklaşık bir hafta içerisinde gelişir ve krem renklidir. Koloniler yumuşak tereyağımsı kıvamda ve pigmentsizdir²¹. Bu NTM türü ülkemizde Baş B tarafından yapılan ve su örneklerinden NTM izolasyonu araştıran çalışmasında bir adet izole edildiği bildirilmiştir²⁶. Yurt dışında yapılan çalışmalarda Chang ve ark, Chilima ve ark, Gruft ve ark, Rahbar ve ark, Sebakova ve ark ve Thomson ve ark sularda NTM araştırdıkları bu kökeni izole edilen türler arasında bildirilmiştir^{80,91,93,94,96,100}.

Çalışmamızda ikinci sıklıkta izole edilen NTM türü *M.gordonae* (3 adet) olmuştur. *M.gordonae* skotokromojen olup yavaş üreyen NTM türleri arasındadır. İçme ve kullanma sularında yaygın olarak bulunan ve laboratuvarlarda kontaminasyona bağlı yalancı enfeksiyona neden olan bu tür, ayrıca lokalize enfeksiyonlardan dissemine enfeksiyonlara kadar değişen farklı enfeksiyon tabloları oluşturabilmektedir. Düşük virulansa sahip olan bu NTM türü AIDS, kanser, diyaliz ve transplantasyon gibi immunsupresyon yapan durumlarda enfeksiyon oluşturabilmektedir^{104,106}. Bu türü ülkemize Akbal H çalışmasında izole ettiği tek NTM tür olarak bildirmiştir⁹⁸. Yine ülkemizde Erköse Genç G çalışmasında *M.gordonae* (10 adet) izole ettiği kökenler

arasında bildirmiştir⁹⁹. Yurt dışında yapılan çalışmalar incelendiğinde bu NTM türünün Hussein ve ark, Fox ve ark, Vantarakis ve ark , Chang ve ark ,tarafından da izole edildiği saptanmıştır^{83,90,92,94}.

Çalışmamızda ikinci sıklıkta izole ettiğimiz diğer köken, potansiyel patajen olan NTM türü *M.szulgai* (3 adet) dir. Yavaş üreyenler grubunda yer alan bu NTM türü skotokromejen olup, 25°C'de fotokromejen görünümündedir. Falkinham JO ve ark, NTM ile enfekte hastaların ev su tesisatlarından alınan su örneklerinin incelenmesinde üç adet *M.szulgai* izole ettiğini bildirmiştir¹⁰⁵. Ülkemizde içme ve kullanma sularında NTM varlığını araştıran çalışmalarda *M.szulgai* varlığı bildirilmemiştir^{26,78,98,99}. Dolayısıyla içme ve kullanma sularında *M.szulgai* varlığı ilk defa ülkemizde tarafımızdan tespit edilmiştir.

Çalışmamızda üçüncü sıklıkta *M.lentiflavum* (2 adet) türü izole edilmiştir. Bu tür yavaş üreyen skotokromejen sınıfına dahil olan bir NTM kekönidir. Araştırmalar incelendiğinde sulardan yaygın olarak izole edilen bir tür olmadığı görülmüştür. Marshall ve ark *M.lentiflavum* izolatlarının klinik önemini değerlendirmek için 2001-2008 yılları arasında Avusturalya'da Brisbane metropoliten alanındaki insanlardan alınan izolatlar ile içilebilir su arasındaki genotipik benzerlik ve coğrafi ilişkiyi araştırmışlardır. Adı geçen çalışmada *M. lentiflavum*, 206 içme suyu alanının 13'ünden izole edilmiş ve suyun alındığı bölge ile hastaların ev adreslerinin karşılaştığını bildirmişlerdir. Otomatik tekrarlanan dizi bazlı PCR genotiplendirmesi, klinik suşlarla yakından ilgili baskın çevre klonunu göstermiştir. Bu bulgu, içilebilir suyun insanlarda *M. lentiflavum* enfeksiyonu için olası bir kaynak olduğuna işaret etmekte olduğunu bildirmişlerlerdir⁹⁷. Torvinen ve ark sekiz farklı bölgeden topladıkları su örneklerinden en sık izole edilen türün *M.lentiflavum* (%55) olduğunu bildirmişlerdir⁵. Ülkemizde ilk defa sulardan *M.lentiflavum* izole edilen çalışma Erköse Genç G tarafından saptanmıştır⁹⁹. Adı geçen çalışmada en sık izole edilen tür *M.lentiflavum* (20 adet) dur. Çalışmamız bu kökeninin sulardaki varlığını bildiren ülkemizdeki ikinci çalışma olması açısından önemlidir.

Çalışmamızda bir adet *M.peregrinum* türü izole edilmiştir. Bu NTM türü klinik önemi tespit edilmiş, pigment üretimi olmayan, kendine özgü bir fenotipi olmayan NTM türüdür⁷⁵. *M.peregrinum* türünün sudan izolasyonu hakkında yapılan çalışmalar sık olmamakla birlikte, Rahbar ve ark bir adet *M.peregrinum* kökenini izole ettiklerini bildirmiştir⁹⁶. Le Dantec ve ark ise şebeke sularından aldıkları örneklerde toplam 3

(üç) tanesinde *M.peregrinum* izole etmişlerdir⁸². Ülkemizde bu NTM türünün, sudan ilk izolasyonunu, Erköse Genç G tarafından yapılmış ve araştırmacı 3 (üç) adet *M.peregrinum* izolasyonu saptamıştır⁹⁹. Ülkemizde adı geçen çalışmanın dışında bu kökeni izole eden başka çalışma saptanmamıştır^{26,78,98}.

Çalışmamızda iki adet *M.chelonae* kökeni izole edilmiştir. Bu NTM türü, pigment üretimi olmayan ve kendine özgü bir fenotipi olan kökendir. *M.fortuitum* gibi hızlı üreyenler grubundan yer alır. Ülkemizde bu NTM türünü sudan izole eden iki adet çalışma saptanmıştır. Baş B yaptığı çalışmada bir adet *M.chelonae* izole ettiğini bildirirken²⁶, Cafri ve ark ise 3 (üç) adet *M.chelonae* türü izole etmiştir⁷⁸. Yurt dışında yapılan çalışmalarda, Vantarakis ve ark ile Rahbar ve ark üçer adet *M.chelonae* türünü sudan izole ettiğini bildirmiştir^{92,96}.

Sonuç olarak bu çalışma, içme kullanma su örneklerinden NTM izolasyon ve identifikasyonu bölgemizde yapılan ilk çalışma olması dolayısıyla önemlidir. Çalışmamızda kullanılan sularda NTM varlığı % 16.6 olarak saptanmış ve en sık saptanan köken *M. fortuitum* olmuştur. Sulardan NTM'nin izolasyon için dekontaminasyonu amacıyla %4 lük NaOH bileşiğinin kullanılmasının, %2'likNaOH ve %0.0005 lik setil prinyum klorid bileşiklerine göre daha iyi dekontaminasyon sağladığı, ısı, sıcaklık ve pH farklarının NTM izolasyonun için anlamlı farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu çalışma esnasında sulardan kaynaklanan NTM mikroorganizmalara yönelik epidemiyolojik araştırmaların ülkemizde çok sınırlı sayıda olduğuda saptanmıştır. Bu durum özellikle immün yetmezlikli bireylerde daha sık görülen NTM infeksiyonlarına kaynaklarına yönelik epidemiyolojik çalışmaların artırılması gerekliliği göstermesi bakımından önemlidir

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda Düzce ilinde farklı bölge ve kaynaklardan toplam 120 adet su örneği toplanarak NTM varlığı araştırılmıştır
2. Bu örneklerden toplam 75 tanesi kurum suyu, kalan 45 tanesi ise mesken sularıdır. Kurum sularından 29 tanesi şebeke, 5 tanesi kaynak ve 11 tanesi depo suyudur. Mesken sularından 63 tane şebeke, 6 tane kaynak, 1 tane depo ve 5 tanesi çeşme suyudur.
3. İzole ettiğimiz NTM türlerini bulduğu su kaynaklarından kurum suyu 10 adet ve mesken suyu 10 adet'dir. Kurum sularının 5 tanesi depo suyu ve kalan 5 tanesi şebeke suyudur. Mesken sularının tamamı şebeke suyudur.
4. Sudan NTM izolasyonu için yapılan çalışmalarda farklı dekontaminasyon yöntemleri ve farklı dekontaminant kimyasalları kullanılmaktadır. NTM izolasyonunda kontaminasyon problemlerini engellemek ve saf bir tür izole edebilmek için, dekontaminasyonda kullanılacak kimyasal maddenin iyi seçilmesi ve bileşiminin iyi ayarlanması gerektiği belirlenmiştir.
5. Suların dekontaminasyonu esnasında kullanılan %4 lük NaOH bileşiğinin kullanılmasının kontaminasyon oranını azalttığı, %2'lik NaOH ve %0.0005 lik setil prinyum klorid ile yapılan dekontaminasyon işleminde kontaminasyon oranının fazla olduğu görülmüştür
6. pH, sıcaklık ve klor miktarının sulardan NTM izolasyonu için anlamlı bir farklılık oluşturmadığı saptanmıştır.
7. Çalışma izole edilen NTM kökenleri sırasıyla *M. fortuitum* (9 adet) , *M.gordonea* (3 adet), *M.szulgai* (3 adet), *M.lentiflavum* (2 adet), *M.chelonae* (2 adet) ve *M.peregrinum* (1 adet) olmuştur. Bu çalışma bölgemizde konu ile ilgili olarak yapılan ilk çalışma olması açısından önemlidir. Bu şekilde hem epidemiyolojik olarak NTM varlığı araştırılmış hemde hangi bölge ve kaynaklardan izole edildiği belirlenmiştir.
9. Bölgemizde yapmış olduğumuz bu çalışma daha kısa zaman aralığında yapılmış olup, daha uzun zaman aralıklarında ve daha çok sayıda örneklerle çalışmaların yapılması epidemiyolojik olarak yerinde olacağını kanaatindeyiz. Ayrıca bu şekilde geniş kapsamlı çalışmaların yapılması bizim tespit edemediğimiz olası var olan türlerin tanımlanmasında katkı sağlayacaktır.

7.KAYNAKLAR

1. Ayşe YÜCE, Nontuberküloz Mikobakteri İnfeksiyonlarında Klinik Yaşam. XXX.Türk Mikrobiyoloji Kongresi 30 Eylül -05 Ekim 20020, Antalya
2. Grubek-Jaworska H, Walkiewicz R, Safianowska A, et al. Nontuberculous mycobacterial infections among patients suspected of pulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 739-44.
3. Abakay Ö, Selimoğlu Şen H. Tüberküloz dışı mikobakterilere bağlı akciğer hastalıkları, *JCEI*, 2013; 4 (2): 252-257.
4. Vaerewijck MJM, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F. Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems: Ecology and Significance for Human Health. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29: 911-934.
5. Torvinen E, Suomalainen S, Lehtola MJ, Miettinen IT, Zacheus O, Paulin L ve ark. Mycobacteria in Water and Loose Deposits of Drinking Water Distribution Systems in Finland. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 1973-1981
6. Albay A. Nozokomiyal Tüberküloz , Mikobakteriyel infeksiyonlar. İçinde Pekcan M, Pahsa A, Gorenk L, Besirbellioglu BA, editorler. *Hastane İnfeksiyonlart*. Ankara: GATA Basimevi; 2005. s. 427-444.
7. Taylor RH, Falkinham JO 3rd, Norton JD, Le Chevallier MW. Chlorine, Chloramine, Chlorine Dioxide, and Ozone Susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1702-1705.
8. Kirschner RA, Parker Jr BC, Falkinham III JO. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum* in Acid, Brown-Water Swamps of the Southeastern United States and Their Association with Environmental Variables. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 271-275.
9. Leoni E, Legnani P, Mucci MT, Pirani R. Prevalence of Mycobacteria in a Swimming Pool Environment. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 683-688.
10. Schulze-Robbeke R, Buchholtz K. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 1869-1873.
11. Eisenstadt J., Hall G. S. (1995) Microbiology and classification of mycobacteria. *Clin. Dermatol.* 13 : 197-206.
12. <http://www.who.int/tb/publications/globalreport/2006/pdf/fullreportcorrectedversion>.

pdf

13. IsemaN M. D. (2002) Klinisyenler için Tüberküloz Kılavuzu Çeviren: Özkara Ş. Nobel Tıp Kitabevleri.
14. Arslan Z. (2005) Tüberküloz hastası ile temaslı çocuklarda, INH profilaksisinin Elispot yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Heybeliada sanatoryumu göğüs hastalıkları ve Göğüs cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
15. Albay A. Nozokomiyal Tüberküloz D1~1 Mikobakteriyel infeksiyonlar. İçinde Pekcan M, Pahsa A, Gorenk L, Besirbellioglu BA, editorler. Hastane Enfeksiyonları. Ankara: GATA Basımevi; 2005. s. 427-444.
16. Barrera R. Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. İçinde Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editorler. Tuberculosis 2007. (İnternette) 2007. s. 93-112. Erişim 25.12.2016, www.tuberculosistextbook.com
17. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, editorler. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby; 2007. s. 478-509.
18. Gauthier D. T., Rhodes M. W. (2009) Mycobacteriosis in fishes: A review. The Vet. J. 180 : 33-47
19. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, editorler, Jawetz, Melnick, & Ade/berg's Medical Microbiology. 22nd ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2001. s. 275-284.
20. Eisenstadt J., HALL G. S. (1995) Microbiology and classification of mycobacteria. Clin. Dermatol. 13 : 197-206.
21. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 5. Baskı . Ankara: Barış yayınları; 2005.
22. Jacobs J. M., Stine C. B., Baya A. M. Kent M. L. (2009) A review of mycobacteriosis in marine fish. J. Fish Dis. 32 : 119-130.
23. Kullavanijaya P. (1999) Atypical mycobacterial cutaneous infection. Clin. Dermatol. 17(2) : 153-158.
24. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editorler, Medical Microbiology. 5th ed. Pennsylvania: Elsevier Mosby; 2005. s. 297-310.
25. Pfyffer GE. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. İçinde Murray PR, editor. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007. s. 543-572.
26. Baş B. Balıklarda ve Sularda Mikobakterilerin PCR-RFLP Analizi İle İncelenmesi 2011, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 73 sayfa, Ankara, (Prof.DR.K.Serdar Diker).

27. Vincent V, Gutierrez MC. *Mycobacterium*: Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria. İçinde Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007. s. 573-588.
28. Springer B, Wu WK, Bodmer T, Haase G, Pfyffer GE, Kroppenstedt RM ve ark. Isolation and Characterization of a Unique Group of Slowly Growing Mycobacteria: Description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1100-1107.
29. Fennelly KP, Ellner JJ. *Mycobacterium tuberculosis* and Other *Mycobacteria*. İçinde Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, editörler. *Infectious Diseases*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2004. s. 2184-2190.
30. Short WR, Emery C, Bhandary M, O'Donnell JA. Misidentification of *Mycobacterium peregrinum*, the Causal Organism of a Case of Bacteremia and Automatic Implantable Cardioverter Defibrillator-Associated Infection, Due to Its Unusual Acid-Fast Staining Characteristics. *J Clin Microbiol* 2005;43:2015-2017.
31. Piersimoni C, Goteri G, Nista D, Mariottini A, Mazzarelli G, Bornigia S. *Mycobacterium lentiflavum* as an Emerging Causative Agent of Cervical Lymphadenitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3894-3897.
32. Sakai T, Kobayashi C, Shinohara M. *Mycobacterium peregrinum* Infection in a Patient with AIDS. *Int Med* 2005; 44: 266-269.
33. Rivera-Olivero IA, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Perez-Alfonzo R, Piquero J ve ark. Soft-tissue Infections due to Non - tuberculous Mycobacteria Following Mesotherapy. What is the Price of Beauty. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 302-306.
34. Santos A, Cremades R, Rodriguez JC, Garcia-Pachon E, Ruiz M, Royo G. *Mycobacterium peregrinum*: Bactericidal Activity of Antibiotics Alone and in Combination. *J Infect Chemother* 2008;14: 262-263.
35. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu. Ed. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M'dan enfeksiyon hastalıkları (1 th ed). Ankara, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd Sti. ,1996. , 396-448.
36. <http://www.oytunerbas.com.tr/wp-content/uploads/2014/05/membran.png>
37. [www. PLoSPathog.org](http://www.PLoSPathog.org)
38. Özışık N. Çok ilaca Dirençli Tüberküloz Hastalarında BACTEC ve Agar Proporsiyon Yöntemi İle Saptanan Etionamid Direncinin Klinik Önemi. Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık Tezi.

İstanbul. 2006.

39. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. *21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu*, Samsun. 2003; 40-47.
40. Zeytinli Ü. Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spolygotyping ve MIRU-VNTR Yöntemiyle Tiplendirilmesi. Uzmanlık tezi, Adana, 2010.
41. Brennan PJ. Structure of mycobacteria: Recent developments in defining cell Wall carbonhydrates and protein. *Rev Infect Dis* 1989, II(sup 2) 240-430.
42. Karaca Ö, Rota S. Tüberküloz İmmunolojisi. *Klimig derg.* 1995; 2:59-62.
43. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis*. 2007.
44. Çoban H. *Mycobacterium tuberculosis'* e ait ESAT-6 VE CFP-10 proteinlerinin ekspresyonu, farklı hasta gruplarında IFN- γ VE IL-10 yanıtlarının saptanması. Uzmanlık tezi, İzmir, 2007.
45. Köksal F. Tüberküloz basilinin kaynak ve evrimi. Tüberküloz Sempozyum kitapçığı, Malatya: 2003; 34-47.
46. Barış İY. Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. *Toraks Dergisi*, 2002; 338-340.
47. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 3684-3689.
48. Babacan F, Over U. Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* complex. İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler, *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2002.s.1675 1690.
49. Del Portillo P, Reyes A, Salazar L, del Carmen Menendez M, Garcia MJ. Chapter 4: Genomics and Proteomics. İçinde Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editorler. *Tuberculosis* 2007. (Intemette) 2007.s.113-.Erisim22.03.08.,
50. Köksal F, Yaman A. Farklı Bir Bakteri Toplulugu Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı. İçinde 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı (13-14 Haziran 2003). Samsun; 2003. s. 34-47.
51. Falkinham III JO. Factors Influencing the Chlorine Susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 5685-5689.
52. Shin JH, Lee HK, Cjo EJ, Yu JY, Kang YH. Targeting the *rpoB* Gene Using Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism for Identification of

- Nontuberculous Mycobacteria in Hospital Tap Water. *J Microbiol* 2008; 46: 608-614.
53. Glickman J. Microbial Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: Dawn of a Discipline. *Cell* 1999; 104 (4): 477-485.
54. Kıyan M. Mycobacteriaceae. Ustaçelebi S, Cengiz AT (Ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi; 1999; 419-455.
55. Wayne LG, Kubica GP. Mycobacteria In: P.H.A.Sneath, (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. *JCM* 1986; 1435-1457.
56. Primm TP, Lucero CA, Falkinham III JO. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin Microbiol Rew* 2004; 17: 98-106.
57. OMÜ Tıp Dergisi 13(4) 297-304-1996 Dr.Belma DURUPINAR Ondokuz Mayıs Üniversitesi , Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji VE Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı SAMSUN.
58. De Waard JH, Robledo J. Chapter 12: Conventional Diagnostic Methods. İçinde Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, Editorler, *Tuberculosis 2007*.(Intemette) 2007.s. 401-424. Erişim 25.12.2016, www.tuberculosisistextbook.com
59. Lee ES,Yoon TH, Lee MY,Han SH, Ka JO. Inactivationnof Environmental Mycobacteria by Free Chlorine and UV. *Water Res* 2010; 44: 1329-1334.
60. Inderlied CB. Mycobacteria. Icinde Armstrong D,Cohen J, editorler. *Infectious Diseases*. London: Harcourt Publishers Ltd; 1999. s. 22.1-22.20.
61. Miyamoto M, Yamaguchi Y, Sasatsu M. Disinfectant Effects of Hot Water, Ultraviolet Light, Silver Ions and Chlorine on Strains of Legionella and Nontuberculous Mycobacteria. *Microbios* 2000; 101: 7-13.
62. Steinert M, Birkness K, White E, Fields B, Quinn F. *Mycobacterium avium* Bacilli Grow Saprozoically in Coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and Survive within Cyst Walls. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 2256-226
63. Han JY, Rosenzweig SD, Church JA, Holland SM, Ross LA. Variable presentation of disseminated nontuberculous mycobacterial infections in a family with an interferon- γ receptor mutation. *CID* 2004; 39: 868-870.
64. Holland SM. Host Defense against Nontuberculous Mycobacterial Infections.*Semin respir Infect* 1996; 11: 217-230.
65. Palmero DJ. Chapter 17: Tuberculosis and HIV/AIDS. Icinde Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editorler. *Tuberculosis 2007*. (Internette) 2007. s. 559-591.

Erisim 25.12.2016, www.tuberculosistextbook.com

66. DAILLOUX M., LAURAIN C., WEBER M., HARTERMANN PH. (1999) Water and nontuberculous mycobacteria. *Wat. Res.* 33 (10) : 2219-2228.
67. Mangione EJ, Huitt G, Lenaway D, Beebe J, Bailey A, Figoski M ve ark. Nontuberculous Mycobacterial Disease Following Hot Tub Exposure. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 1039-1042.
68. Marras TK, Wallace RJ, Koth LL, Stulbarg MS, Cowl CT, Daley CL. Hypersensitivity Pneumonitis Reaction to *Mycobacterium avium* in Household water. *Chest* 2005; 127: 664-671
69. Tuksavul F, Güçlü SZ, Çavuşoğlu C, Uslu Ö, Erbaycu AE, Günaçtı E. İmmün Yetmezliği Olmayan bir Eriskinde *Mycobacterium kansasii*'nin Neden Oldugu Akciger enfeksiyonu (olgu sunumu). *Archives of Lung* 2005; 6: 123-12.
70. Arend SM, de Palou EC, de Haas P, Janssen R, Hoeve MA, Verhard EM. Pneumonia Caused by *Mycobacterium kansasii* in a Series of Patients Without Recognised Immune Defect. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 738-748
71. Tobin-D'Angelo MJ, Blass MA, del Rio C, Halvosa JS, Blumberg HM, Horsburgh CR. Hospital Water as a Source of *Mycobacterium avium* complex Isolates in Respiratory Specimens. *JID* 2004; 189: 98-104.
72. Meunier O, Oster JL, Rousee JM, Georges S, Hernandez C, Bientz M. Non-tuberculous Mycobacteria and Home Aquariums. *J Hosp Infect* 2003; 55:80-81.
73. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve 2.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri-Kursu,Samsun.
74. Suriicuoğlu S. Tüberküloz Basilinin Identifikasyonu. İcinde 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı (13-14Haziran 2003). Samsun;2003.s.30-43
75. Brown-Elliott BA, Wallace Jr RJ. *Mycobacterium*:Clinical and Laboratory Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria. İcinde Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007. s.589-600.
76. Tortoli E, Palomino JC. Chapter 14: New Diagnostic Methods. İcinde Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editorler. *Tuberculosis*2007. (İnternette) 2007.s. 441-486. Erişim 25.12.2016, www.tuberculosistextbook.com
77. Cafri U, Aslan G, Direkel Ş, Tarhan G, Ceyhan İ, Emekdaş G. Çevre Örneklerinden Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin izolasyonu ve Tanımlanması. *Mikrobiyol Bul* 2010;

44: 395-403.

78. Cafri U. Çevre Örneklerinden İzole Edilen Mikobakterilerin izolasyonu ve Tiplendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi 2004.

79. Schulze-Robbecke R. Atypische Mykobakterien. İçinde Feuerpfeil I, Botzenhart K, Editörler, *Hygienisch-Mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis*. Weinheim, Germany: WILEY-VCH; 2008. s. 214- 223.

80. Sebakova H, Kozisek F, Mudra R, Kaustova J, Fiedorova M, Hanslikova D ve ark. Incidence of Nontuberculous Mycobacteria in Four Hot Water Systems Using Various Types of Disinfection. *Can J Microbiol* 2008; 54: 891-898.

81. Sheffer P. J., Stout J. E., Wagener M. M., Muder R. R. (2005) Efficacy of new point-of-use water filter for preventing exposure to Legionella and waterborne bacteria. *Am. J. Infect. Control*. 33 (5) : 20-25.

82. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5318-25.

83. Hussein Z, Landt O, Wirths B, Wellinghausen N. Detection of Non-tuberculous Mycobacteria in Hospital Water by Culture and Molecular Methods. *Int J Med Microbiol* 2009; 299: 281-290.

84. Goldman E. , Green L. H. (2009) Practical Handbook of Microbiology. Newyork: CRC Press. 2nd. Ed. Chapter 31.

85. Richter E, Rusch-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1769-1775.

86. Russo C, Tortoli E, Menichella D. Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 334-339.

87. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 2492-2496.

88. Narang R, Narang P, Mendiratta DK. Isolation and identification of nontuberculosis mycobacteria from water and soil in central India. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 247.50.

89. Phillips MS, Von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1363-74.

90. Fox C, Smith B, Brogan O, Rayner A, Harris G, Watt B. Non-tuberculous

Mycobacteria in a Hospital's Piped Water Supply. *J Hosp Infect* 1992; 21: 152-154.

91. Chilima B. Z., Clark I. M., Floyd S., Fine P. E. M., Hirsch P. R. (2006) Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, Northern Malawi. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (4) : 2343-2350.

92. Vantarakis A, Tsintzou A, Diamandopoulos A, Papapetropoulou M. Non-tuberculous Mycobacteria in Hospital Water Supplies. *Water Air Soil Poll* 1998; 104: 331-337.

93. Gruft H., Falkinham J.O., Parker B. C. (1981) Recent experience in the epidemiology of disease caused by atypical mycobacteria. *Rev. Infect. Dis.* 3 (5) : 990-996.

94. Chang C, Wang L, Liao C, Huang S. Identification of Nontuberculous Mycobacteria Existing in Tap Water by PCR-restriction Fragment Length Polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 3159-3161.

95. Conger NG, O'Connell RJ, Laurel VL, Olivier KN, Graviss EA, Williams-Bouyer N ve ark. *Mycobacterium simiae* Outbreak Associated with a Hospital Water Supply. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 1050-1055.

96. Rahbar M, Lamei A., Babazadeh H., Yavari S. A. (2010) Isolation of rapid growing mycobacteria from soil and water in Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (24) : 3681-3621.

97. Marshall HM, Carter R, Torbey MJ, Minion S, Tolson C, Sidjabat HE, Huygens F, Hargreaves M, Thomson RM. *Mycobacterium lentiflavum* in drinking water supplies, Australia.

98. Akbal H. Çevre örnekleri ve klinik materyallerden üretilen mikobakterilerin tiplendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Yüksek Lisans Tezi, 1998.

99. Erköse Genç G, Richter E, Erturan Z. Isolation of nontuberculous mycobacteria from hospital waters in Turkey, *APMIS*, Cilt 121, sayfa 1192–119, 2013

100. Thomson R, Carter R, Gilpin C, Coulter C, Hargreaves M. Comparison of Methods for Processing Drinking Water Samples for the Isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 3094-3098.

101. Schulze-Robbecke R, Weber A, Fischeder R. Comparison of Decontamination Methods for the Isolation of Mycobacteria from Drinking Water Samples. *J Microbiol Meth* 1991; 14: 177-183.

102. Peters M, Muller C, Rusch-Gerdes S, Seidel C, Gobel U, Pohle HD, Ruf B. Isolation of Atypical Mycobacteria from Tap Water in Hospitals and Homes: Is This

a Possible Source of Disseminated MAC Infection in AIDS Patients? *J Infect* 1995; **31**: 39-44.

103. Fabroni C., Buggaani G., Lotti T. (2008) Therapy of environmental mycobacterial infections. *Dermatol. Ther.* **21** : 162-166.

104. Fujita J, Nanki N, Negayama K, Tsutsui S, Taminato T, Ishida T. Nosocomial Contamination by *Mycobacterium gordonae* in Hospital Water Supply and Super oxidized Water. *J Hosp Infect* 2002; **51**: 65-68.

105. Falkinham JO, Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 17, No. 3, March 2011.

106. Jarikre LN. *Mycobacterium gordonae* Genitourinary Disease. *Genitourin Med* 1992; **68**: 45-46.