

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

**TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKOBAKTERİ
ETKENLERİNİN TÜR DÜZEYİNDE
TANIMLANMASI**

DR. ÖZGÜR APPAK

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2011

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

**TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKOBAKTERİ
ETKENLERİNİN TÜR DÜZEYİNDE
TANIMLANMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜR APPAK

**Danışman Öğretim Üyesi
PROF. DR. NURAN ESEN**

TEŐEKKÖR

Asistanlığım boyunca ve tezimin tamamlanması için geçen süreçte bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini ve çabasını benimle paylaőan danışman hocam Prof. Dr. Nuran ESEN'e, eğitimime katkılarından dolayı baőta Anabilim Dalı Baőkanımız Prof. Dr. Hakan ABACIOđLU olmak üzere tüm değerli hocalarıma, aynı çalışma ortamını paylaőmaktan dolayı mutluluk duyduğum asistan arkadaőlarıma teőekkr ederim.

Beni yetiőtiren, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan aileme ve desteđini her zaman yanımda hissettiđim sevgili eőime teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER LİSTESİ	i
TABLO LİSTESİ.....	iii
RESİM LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMALAR	vi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Tüberküloz Hastalığının Tarihçesi	4
4.2. Dünya’da ve Türkiye’de Tüberküloz ve Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Epidemiyolojisi	6
4.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri.....	10
4.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması.....	12
4.5. Tüberküloz Dışı Mikobakterin Tanısı	15
4.6. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı	16
4.6.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi.....	16
4.6.2. Mikroskopik İnceleme.....	17
4.6.3. Kültür Yöntemleri	18
4.6.3.1. BACTEC 460 TB	20
4.6.3.2. MGIT 960	21
4.7. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Tanımlanması	21
4.7.1. Fenotipik Testler	21
4.7.2. Moleküler Testler	25
4.7.2.1. DNA Dizi Analizi	25
4.7.2.2. Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri	26
4.7.2.3. PZT-Restriksiyon Enzim Analizi Yöntemi (PRA).....	27
4.7.2.4. “Single-Stranded Conformation Polymorphism” (SSCP) Yöntemi	27
4.7.2.5. “DNA Microarray”	28
4.7.3. Mikolik Asit Analizi.....	28
5. GEREÇ VE YÖNTEMİ.....	29

5.1. Çalışma Grubu.....	29
5.2. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin LJ Besiyerinde Üretilmesi.....	29
5.3. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Moleküler Tiplendirilmesi.....	29
5.3.1. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin DNA İzolasyonu.....	29
5.3.2. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin HSP65 Gen	
Bölgelerinin PZT ile Çoğaltılması.....	30
5.3.3. Agaroz Jel Elektrophorezi	31
5.3.4. Gösterilen DNA Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi.....	32
5.3.5. Metafor Agar Jel Elektrophorezi.....	32
5.3.6. Restriksiyon Enzimleriyle Kesim Sonucu Oluşan Paternlerin	
Tür Tanımlama Cetveline Göre Tanımlanması	33
6. BULGULAR.....	37
6.1. İzolatlar.....	37
6.2. PZT- Restriksiyon Enzim Analizi Yöntemi Sonuçları	39
7. TARTIŞMA.....	51
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
9. KAYNAKLAR.....	59

TABLO LİSTESİ

Tablo-1. Runyon Sınıflaması	13
Tablo-2. Woods ve Washington Sınıflaması	14
Tablo-3. Karbolfuksin ve Florokrom Yöntemiyle Boyanmış Preperatların Değerlendirilmesi ve Sonuçlarının Bildirilmesi	18
Tablo-4. Mikobakterilerin Tanımlamasında Kullanılan Biyokimyasal Özellikler	24
Tablo-5. Mikobakteri Tür Tanımlama Cetveli.....	34
Tablo-6. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks ve TDM'lerin Yıllara Göre Dağılımı	37
Tablo-7. Çalışmaya alınan Kalite Kontrol Suşları.....	38
Tablo-8. PZT-Restriksiyon Enzim Analizi Paternleri ve Sonuçları	43
Tablo-9. Tüberküloz Dışı Mikobakteri Türlerinin Örneklere Göre Dağılımı.....	50

RESİM LİSTESİ

Resim 1. 2009 Yılında Dünya’da Tüberküloz İnsidansı.....	8
Resim 2. Mikobakterilerin Erlich Ziehl Neelsen Boyama Görüntüsü	11
Resim 3. Mikobakteri Hücre Duvarı.....	12
Resim 4. Löwenstein Jensen besiyerinde üreme saptanan klinik örnek	38
Resim 5. Koloniden hazırlanan Kinyoun Preperatı.....	38
Resim 6. TDM’lerden Elde Edilen PZT Bant Görünümleri	39
Resim 7. PZT-Restriksiyon Enzim Analizi Kesim Paternleri.....	39
Resim 8. PZT-Restriksiyon Enzim Analizi Kesim Paternleri.....	40
Resim 9. PZT-Restriksiyon Enzim Analizi Kesim Paternleri.....	41
Resim 10. PZT-Restriksiyon Enzim Analizi Kesim Paternleri.....	41
Resim 11. PZT-Restriksiyon Enzim Analizi Kesim Paternleri.....	42

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. TDM Sonuçlarının Yıllara Göre Dağılım Grafikleri	48
Şekil 2. TDM Sonuçlarının Dağılım Grafiği.....	49

KISALTMALAR

ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
ARB:	Aside dirençli bakteri
BL:	Bronş lavaj
BAL:	Bronkoalveolar lavaj
BCG:	<i>Bacille Calmette-Guerin</i>
CDC:	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI:	<i>The Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DGTS:	Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EMB:	Etambutol
EZN:	Erlich Ziehl-Neelsen
HIV:	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
INH:	İsoniazid
LJ:	Löwenstein-Jensen
MAK:	<i>Mycobacterium avium</i> kompleks
MTK:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks
NALC:	N-Asetil-L-Sistein
NaOH:	Sodyum hidroksit
NAP:	<i>p-nitro-α-acetylamino-β-hydroxypropiophenone</i>
OT:	<i>Old tuberculin</i>
PAS:	Para-aminosalisilik asit
p-NBA:	Paranitrobenzoik asit
PPD:	Pürifiye protein deriveleri
PRA:	Polimeraz Zincir Tepkimesi -Restriksiyon Enzim Analizi
PZA:	Pirazinamid
PZT:	Polimeraz Zincir Tepkimesi
RE:	Restriksiyon enzimi
RFLP:	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIF:	Rifampisin
SSCP:	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
TB:	Tüberküloz
TDM:	Tüberküloz Dışı Mikobakteri

1. ÖZET

Tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) etkenlerinin tür düzeyinde tanımlanması

Tüberküloz dışı mikobakterilerin günümüzde 125'den fazla türü tanımlanmıştır. Tüberküloz dışı mikobakteriler çevrede her yerde, sıklıkla toprakta, hem doğal hem de işlenmiş su kaynaklarında bulunmaktadır. Genellikle immün süpresif tedavi alan ya da immün yetmezliği olan insanlarda hastalık oluşturmalarına rağmen bağışıklık sistemi normal kişilerde de TDM'lerin neden olduğu enfeksiyonların sıklığı giderek artmaktadır. Tüberküloz dışı mikobakteri türleri arasında klinik seyir ve tedaviler farklılık göstermektedir. Tüberküloz dışı mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanabilmesi için ucuz, kolay ve hızlı sonuç veren yöntemin uygulanması, TDM türleri ile meydana gelen enfeksiyonların klinik ve ekonomik açıdan duyarlı olduğu bilinen ilaçlar ile etkin tedavilerine olanak sağlar.

Bu amaçla Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında, 2004-2010 yılları arasında solunum yolu örneklerinden soyutlanan 156 adet TDM izolatu çalışmaya alındı. Tüberküloz dışı mikobakterilerin hsp65 gen bölgesini hedef alan PZT-restriksiyon enzim analizi yöntemi (PRA) kullanıldı.

Çalışmamızda TDM'lerin tür dağılımı; *Mycobacterium abscessus* tip 1 (69/156), *Mycobacterium xenopi* (26/156), *Mycobacterium fortuitum* (14/156), *Mycobacterium porcinum* tip 1, *Mycobacterium septicum* tip 1, *Mycobacterium peregrinum* tip 2 (14/156), *Mycobacterium simiae* tip 5, *Mycobacterium lentiflavum* tip 1, *Mycobacterium florentinum* tip 1 (5/156), *Mycobacterium intracellulare* tip 1, *Mycobacterium chimaera* tip 1 (5/156), *Mycobacterium genavense* tip 2, *M. simiae* tip 1 (4/156), *Mycobacterium chelonae* (2/156), *Mycobacterium novocastrense* (1/156), *Mycobacterium gordonae* tip 6 (1/156), *Mycobacterium colombiense* tip 1, *Mycobacterium avium s. avium* tip 2 (1/156), *Mycobacterium massiliense* tip 1, *Mycobacterium bolletii* tip 1, *M. abscessus* tip 2 (2/156), *M. avium s. avium* tip1, *M. avium s. paratuberculosis* tip 1, *M. avium s. silvaticum* tip 1 (2/156) olarak sonuçlandı. On TDM izolatu hsp65 PRA yöntemi ile tanımlanamadı.

Sonuç olarak, doğada çok yaygın olarak bulunan tüberküloz dışı mikobakteriler günümüzde artan sıklıkta ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Antimikrobiyal duyarlılıklarındaki farklılıklar nedeniyle TDM'lerin etkin ve doğru şekilde tedavi edilmesi ayrıca epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesi için TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanması önemlidir. Bu amaçla kullanılan hsp65 PRA yöntemi, kolay uygulanabilen, hızlı, güvenilir ve ucuz bir yöntemdir.

Anahtar kelimeler: Tüberküloz dışı mikobakteri, moleküler tiplendirme, hsp65 PRA,

2. SUMMARY

Species level identification of non-tuberculous mycobacteria

More than 125 species of non-tuberculous mycobacteria (NTM) has been defined recently. NTM species can be easily isolated in soil, natural or purified water sources. Although these agents are considered as pathogens in immune compromised or immune suppressed patients, rate of infection in patients with intact immune system has also increased. The clinical course and therapy can differ among different species of NTM. Cheap, fast and simple methods in identification of NTM species should be helpful to eliminate the pathogens cost effectively.

In this study, 156 isolates of NTM collected from respiratory tract between 2004 and 2010 in Dokuz Eylul University Central Laboratory have been studied. PCR-restriction enzyme analysis (PRA) targeting hsp65 gene location has been used to identify NTM species.

In our study, distribution of the identified species were as follows; *Mycobacterium abscessus* type 1 (69/156), *Mycobacterium xenopi* (26/156), *Mycobacterium fortuitum* (14/156), *Mycobacterium porcinum* type 1, *Mycobacterium septicum* type 1, *Mycobacterium peregrinum* type 2 (14/156), *Mycobacterium simiae* type 5, *Mycobacterium lentiflavum* type 1, *Mycobacterium florentinum* type 1 (5/156), *Mycobacterium intracellulare* type 1, *Mycobacterium chimaera* type 1 (5/156), *Mycobacterium genavense* type 2, *M. simiae* type 1 (4/156), *Mycobacterium chelonae* (2/156), *Mycobacterium novocastrense* (1/156), *Mycobacterium gordonae* type 6 (1/156), *Mycobacterium colombiense* type 1, *Mycobacterium avium* s. *avium* type 2 (1/156), *Mycobacterium massiliense* type 1, *Mycobacterium bolletii* type 1, *M. abscessus* type 2 (2/156), *M. avium* s. *avium* type 1, *M. avium* s. *paratuberculosis* type 1, *M. avium* s. *silvaticum* type 1 (2/156). Ten isolates of NTM could not be identified with hsp65 PRA.

In conclusion, wide spread distribution of NTM species in nature causing serious infections have been increased recently. It is important to identify NTM on a species basis to supply with proper antibacterial treatment since there are certain susceptibility differences to antibacterial drugs; furthermore, the data also holds an epidemiological importance. For that manner, to identify NTM species, hsp65 PRA method is cheap, fast, reliable and simple to use in daily practice.

Keywords: Non-Tuberculosis Mycobacterium, molecular typing, hsp65 PRA

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde immün yetmezliğe neden olan HIV gibi viral enfeksiyonlar, kortikosteroid kullanımı, kollajen vasküler hastalık, lösemi, lenfoma gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda ve immün sistemi sağlam olan kişilerde de tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) neden olduğu hastalıklar giderek artan sıklıkta görülmektedir. Aynı zamanda antimikrobiyal duyarlılıklarındaki farklılıklar yüzünden TDM'leri tür düzeyinde tanımlamanın klinik önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle tedaviye başlanmadan önce mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Tüberküloz tanısında ilk basamak, aside dirençli boyama yöntemlerinin uygulanmasıdır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basil görülmesinden sonra, klinik ve radyolojik bulgular da tüberküloz tanısını desteklemekten yoksun, genellikle tedaviye hemen başlanmaktadır. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ile TDM'lerin mikroskopik inceleme ile ayırt edilmesi mümkün değildir ve TDM türlerinin büyük çoğunluğu klasik antitüberküloz ilaçlara karşı dirençlidir, bu nedenle TDM ile enfekte hastalarda tedavi etkisiz kalmaktadır. Bu durum hem hastaya yararı olmayan ilaçların gereksiz kullanılmasına, hem de hastanede kalış süresinin uzamasına neden olarak hastane enfeksiyon riskinin artmasına ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler; zahmetli, uzun zaman gerektirmekte ve sadece belli türleri birbirinden ayırt edebilmektedir. Aynı zamanda yeni mikobakteri türlerinin tanımlanmasında da yetersiz kalmaktadırlar. Bu yüzden günümüzde DNA dizi analizi, SSCP yöntemi, nükleik asit hibridizasyon yöntemleri, PRA ve DNA microarray yöntemleri TDM türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu moleküler yöntemler mikobakteri türlerinin tanımlanmasında hızlı ve güvenilirlerdir.

Bu çalışmada DEÜ Hastanesi Merkez Laboratuvarında izole edilen TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanmasının rutin olarak yapılması için; ucuz, kolay ve hızlı sonuç veren bir yöntemin uygulanması ve TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanmasının tedaviye etkisinin yorumlanması amaçlanmıştır. Bu nedenle çalışmamızda Mikobakteriyoloji Laboratuvarında; Löwenstein Jensen, BACTEC 460 TB ve MGIT 960 kültür sistemleri ile solunum yolu örneklerinden TDM olarak saptanan izolatların PRA yöntemiyle tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1 Tüberküloz hastalığının tarihçesi

Tüberküloz (TB), “*Mycobacterium tuberculosis* kompleks” olarak adlandırılan bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan, enfekte dokularda granülomların varlığı ile karakterize, kronik, nekrotizan, bakteriyel bir hastalıktır [1].

Tüberküloz etkenlerinin varlığı, insanlığın varoluşundan çok öncelere dayanmakta iken, TB hastalığı; insanların toplu yaşama geçtiği dönemlerde fark edilmiştir. Toplumlarda büyük tahribatlar ve kitlesel ölümlere neden olmuştur [2]. Günümüzde de önemini koruyan TB hastalığına tarihsel süreç boyunca birçok isim verilmiştir. Yakaladığı insanı eriterek öldürdüğü için “Tüketim Hastalığı”, hastaları soldurarak ölüme neden olduğu için “Beyaz Ölüm” veya “Beyaz Veba”, asırlarca birçok insanın ölümüne neden olduğu için de “Ölümün Kaptanı” adıyla bilinir. Romalılar bu hastalığa hırıltılı nefes alıp verme ve öksürükle balgam atma anlamında “Phtisis” adını koymuşlar ve veremle ilgilenen doktorlara Fizyolog demişlerdir. Bizim dilimizde ise “İnce Hastalık” en çok kullanılan terimdir [3].

Yüz elli milyon yıldan beri varlığını sürdüren TB mikrobunu doğada her yerde (örneğin sulara, meralarda, toprakta, samanda, vs.) bulunabilen bir bakteridir. İnsanlara geçmesi, muhtemelen eski çağlarda sığırların evcilleştirilmesi ile başlamıştır. *Mycobacterium tuberculosis bovis* ile enfekte etlerin yenmesi ve sütlerinin içilmesiyle insanlar bu bakteri ile enfekte olmuşlardır. Sonuçta fatal olmayan, çoğunlukla kendiliğinden iyileşen özellikle boyun lenf bezleri ve kemikleri tutan TB hastalığı görülmüştür. Uzun yıllar içerisinde basilin DNA’sı değişerek, akciğerleri tutan ve öksürükle bulaşan insan tipi TB basili (*Mycobacterium tuberculosis humanus*) haline dönüştüğü düşünülmektedir. Daha sonra bu bakteri insanların toplu yaşama geçişiyle birlikte, önce toplum içi daha sonra toplumlar arası yayılım göstermeye başlamıştır [4, 5].

Tarihsel süreç içerisinde TB hastalığını düşündürecek bulgular arasında; Almanya’da bulunan insan iskeletlerinde (M.Ö. 5000) aside dirençli basil (ARB) saptanması, M.Ö. 3500-3000 yıllarına ait Mısır mumyaları ve Ürdün’de bulunan insan iskeletlerinde Pott hastalığı ve Psoas apseleri görülmesi, Mısır’da Nil yakınlarındaki bir mezarda (M.Ö. 1500) lenf bezi TB’sine ait belgenin bulunması sayılabilir. En iyi TB kanıtı, M.S. 700 civarında yaşayan, sekiz yaşındaki İnka erkek çocuğu mumyasından elde edilmiştir. Bu mumyanın omurga grafisinde Pott hastalığına ait bulgular saptanmış ve lezyon yaymalarında aside dirençli basiller görülmüştür [2].

Hipokrat (M.Ö. 460–377) TB'yi, zamanın yaygın hastalığı olarak tanımlamış, genellikle 18-35 yaş arasındaki kişilerde görüldüğünü ve neredeyse her zaman ölümle sonuçlandığını bildirmiştir. M.S. 2. yüzyılda yaşayan Galen ise tedavi önerilerini ortaya koymuştur. Bu öneriler, istirahat, öksürüğün kesilmesi, göğüs yakıları, venden kan alımı, sülük uygulaması, kusturucular, müshiller, kabartıcı maddelerle ciltte yaralar oluşturmak şeklinde özetlenebilir. Andreas Vesalius (M.S. 1478) fitizisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonların bulunduğunu bildirmiştir. Franciscus Sylvius (1614–1672) ise TB'den ölen hastaların akciğerlerinde küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstererek bunları tüberkül olarak adlandırmıştır [2, 6].

Robert Koch (1843-1910); 1882 yılında TB'den ölen Heinrich Günther isimli 32 yaşındaki hastasının akciğerindeki lezyonlarından basili izole etmiştir. Daha sonra saf kültürünü üretmiş ve deneysel olarak hayvanlarda hastalık oluşturmuş ve enfekte hayvanlardan bakteriyi yeniden üreterek Koch postülatını tanımlamıştır. Bakteri ilk başlarda *Bacterium tuberculosis* olarak adlandırılmış; ancak daha sonra 1886 yılında Lehmann ve Neuman tarafından koloni morfolojisi ve yavaş üreme özelliği nedeniyle *Mycobacterium tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir. Koch 1890 yılında *M. tuberculosis* ekstresi olan “old tuberculin” ile hastalığın özel bağışıklık ve alerjisini ortaya koymuştur [7]. 1921 yılında Fransız araştırmacılar Albert Calmette ve Camile Guérin sığır TB basilini 230 kez pasaj yaparak ilk TB aşısı olan Bacillus Calmette-Guérin (BCG)'i geliştirmişlerdir. Seibert ve Glenn 1939 yılında “old tuberculin”in saflaştırılmasıyla elde edilen tüberkülinin saflaştırılmış protein türevi olan “Purified Protein Derivative” (PPD)'i hazırlamıştır [3, 6].

Yirminci yüzyılın başlarında, sert ve temiz dağ havasının iyi geldiği düşüncesiyle, yüksek yerlerde sanatoryum denilen verem hastaneleri kuruldu. İlk sanatoryumun 1854 yılında Almanya'da açılmasıyla TB tedavisinde farklı bir yaklaşım başladı. W. Roentgen'in 1895 yılında X ışınını bulmasından sonra sanatoryumlar; radyolojik, bakteriyolojik ve floroskopik incelemelerin yapıldığı TB tanı, tedavi ve araştırma merkezleri haline gelmişlerdir. Bu dönemde TB hastalığı, sanatoryum ve cerrahi yöntemler ile tedavi edilmeye çalışılıyordu. Ancak bu yöntemlere tam bir yanıt alınamamakta ayrıca hastaların sanatoryumlarda izole olmaları ve cerrahi sonrası toraksın görünümünün bozulması nedeniyle ruhsal durumları etkilenmekteydi [5].

1940'lı yıllarda para-aminosalisilik asit (PAS) ve streptomisin bulunmasıyla TB tedavisinde yeni bir dönem başlamıştır. Ancak bu ilaçların mono-terapilerine kısa sürede direnç gelişmesi ve sık relaplara yol açması neticesinde PAS ve streptomisin birlikte verilmeye başlanmıştır. 1952 yılında izoniazidin (INH) bulunmasından sonra üç ilacın 18-24

ay süreyle uygulanması sonucunda TB tedavi edilebilir bir hastalık olmuştur. Daha sonra 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında ethambutol (EMB), 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur. 1980’li yılların başlarında izoniazid ve rifampisin birlikte verildiğinde tedavinin 9 aya indirilebileceği, üstelik bunlara PZA de eklendiğinde 6 ay gibi daha kısa bir sürede tedavinin yeterli olabileceği tespit edilmiştir [6, 8].

Mycobacterium tuberculosis kompleks dışında kalan tüm mikobakterilere, Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) (*nontuberculosis mycobacteria-NTM*) (*Mycobacteriae other than tuberculosis- MOTT*) denilmektedir. İlk defa 1950 yıllarında geleneksel TB tedavisine cevap vermeyen TB hastalarının %1-2’sinde insan patojeni olarak tanımlanmışlardır [9]. Günümüzde göreceli olarak belirsiz ve özgül olmayan semptomlara neden olan 125’den fazla TDM; çevrede her yerde, sıklıkla toprakta, hem doğal hem de işlenmiş su kaynaklarında bulunmaktadır. Tüberkülozdan farklı olarak TDM’lerle gelişen hastalık, çevresel organizmalarla maruziyete bağlıdır. İnsandan insana geçişle ilgili hiçbir vaka bildirilmemiştir. Genellikle immün süpresif tedavi alan ya da immün yetmezliği olan insanlarda hastalık oluşturmaktadır [10]. Tüberküloz dışı mikobakteriler insanlarda önemli klinik tablolara neden olmaktadır. Bunlar arasında pulmoner enfeksiyonlar, lenfadenitler, disemine enfeksiyonlar, lokalize deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, tendon-kemik-eklem enfeksiyonları ve kateter enfeksiyonları bulunmaktadır [11].

Seksenli yıllara gelindiğinde batı ülkelerinde TB sorununun artık bittiği ve hastalık eradikasyonunun yakında mümkün olabileceği düşünülüyordu. Ancak 1985 yılından itibaren bu ülkelerde, TB ve TDM insidansı, immün yetmezliğe neden olan “*Human immunodeficiency virus*” (HIV) gibi viral enfeksiyonlar ve uygulanan bağışıklık sistemini baskılayan tedaviler nedeniyle tekrar artarak, hastalık yeniden tehdit edici boyutlara ulaşmıştır [12].

4.2 Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz ve Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Epidemiyolojisi

Genellikle yoksul ve gelişmekte olan ülkelerin bir sorunu olan TB’nin görülme sıklığı, bütün dünyada giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bu artışın nedenini; hükümetlerin hastalığı önemsememeleri sonucunda kötü yönetilen veya doğru yaklaşımların uygulanmadığı TB kontrol programları, HIV epidemileri, TB’nin sık görüldüğü ülkelere göçler ve ekonomik yetersizlikler olarak açıklamaktadır. Tüberküloz hasta sayılarındaki artışlar ve TB kontrolü çabalarının yeterince başarı sağlayamaması nedeniyle, DSÖ 1993 yılında ilk kez bir hastalık için acil durum ilan etmiş ve yeni bir TB kontrol stratejisi hızla

yayınlanmıştır. Günümüzde TB kontrolünün temel yöntemi olan bu strateji, doğrudan gözetimli tedavi stratejisidir (DGTS) [13].

DGTS stratejisi:

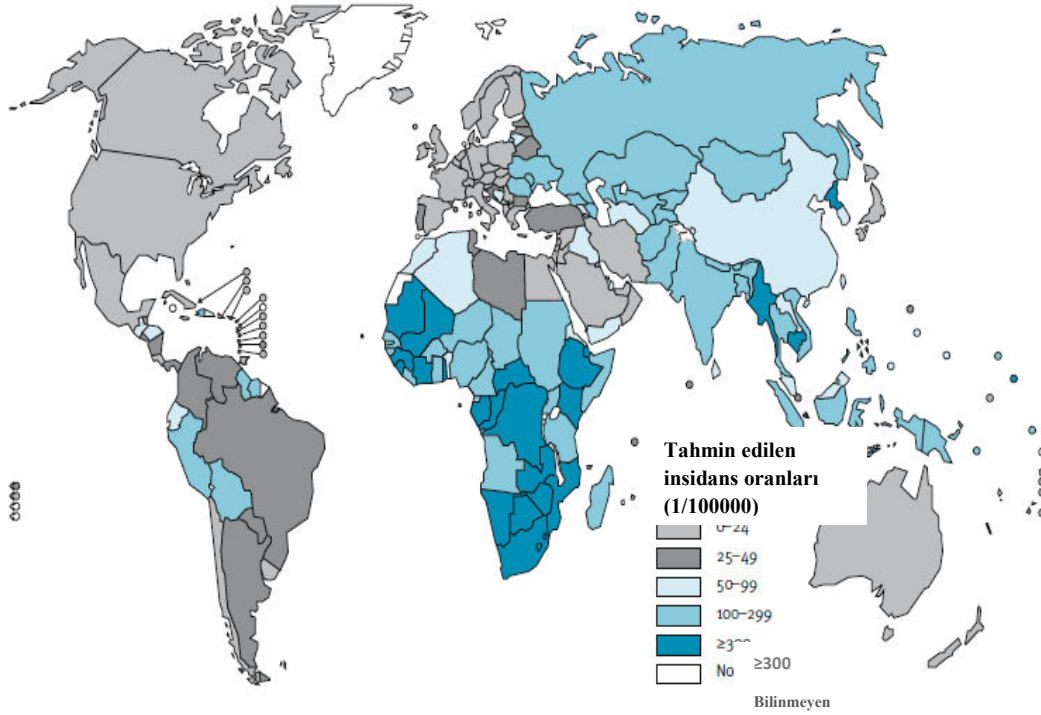
1. TB kontrolü ile ilgili uygulamalar için politik iradenin ortaya konması,
2. Semptomatik hastalarda pasif yöntemle bakteriyolojik tanı,
3. Gözetimli tedavi,
4. Ücretsiz ve sürekli ilaç sağlanması,
5. Kayıt - raporlama- analiz sistematığının kurulması, unsurlarını içermektedir.

2000 yılında Birleşmiş Milletler tarafından “Milenyum Gelişim Hedefleri” belirlenmiştir. Bu hedefler arasında; a) 2015 yılında 1990 yılına göre TB prevalansını ve mortalitesini %50 azaltmak, b) insidans artışını durdurmak ve azalmaya başlamasını sağlamak, c) DGTS uygulayarak yeni yayma pozitif olgulardan en az %70’ini saptamak ve bu olgulardan %85’ini başarılı şekilde tedavi etmek yer almaktadır [14]. 2007 yılında dünya genelinde 36 ülke ve Batı Pasifik Bölgesi bu hedeflere ulaşmıştır. Türkiye, hem olgu bulmada hem de tedavi başarısında, hedeflerine ulaşmış 36 ülkeden biri olmuştur [13].

Dünya Sağlık Örgütü’nün Küresel TB Kontrolü 2010 Raporu’nda, 2009 yılı için tahmin edilen olgu sayısının 9,4 milyon olduğu bildirilmiştir (137/100.000). Bu hastaların 1.1 milyonu HIV pozitif hastadır ve HIV pozitiflerin %80’i Afrika’da yaşamaktadır. Bugün 22 ülke TB hastalarının %81’ini barındırmaktadır. En çok hastaya sahip ülkeler, Hindistan, Çin, Endonezya, Nijerya ve Güney Afrika’dır. 2009 yılı için TB prevalansı 14 milyon (200/100.000) ve TB hastalığından ölüm sayısı 1,3 milyon (20/100.000) olarak belirlenmiştir [15].

Ülkemizde 1930’larda “Umumi Hıfzıssıhha Kanunu”nun çıkması ile devletin verem savaşı faaliyetleri konusundaki politik kararlılığı ortaya konulmuş ve 1949 tarihli “Veremle Mücadele Kanunu” ile verem savaşı hizmetlerinin yasal çerçevesi çizilmiştir. Ülkemizde TB ile etkin mücadele 1950’li yıllarda başlatılmış ve 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur. Bunun sonucu olarak 1945 yılında TB ölümleri yüz binde 262 iken, 1950 yılında yüz binde 204’e düşmüştür. Ülkemizdeki TB hastalık insidansı, 2008 yılında Verem Savaş Dispanserlerine kayıtlı hastalara göre hesaplandığında yüz binde 25,8’dir Hastalık insidansı Avrupa ülkelerinin çoğunda yüz binde 20’den az iken, Hindistan, Bangladeş, Çin gibi ülkelerde yüz binde 100’ün üstünde hatta yüz binde 200’ün üstündedir (Şekil 1). [13, 16].

Resim 1. 2009 yılında Dünyada Tüberküloz İnsidansı



Türkiye’de doğrudan gözetimli tedavi stratejisine yönelik ilk uygulamalar 2000 yılında başlamış, 2006 yılında ise tüm ülke geneline yaygınlaştırılmıştır. “Türkiye’de Verem Savaşı 2010 Raporuna” göre; kayıtlı TB hastalarının toplam sayısı 2007 yılında 19.694 iken 2008 yılında 18.452 olmuştur ve olgu hızındaki yıllık değişimde %7 düşüş görülmüştür. Kayıtlı 18.452 hastanın 16.760’ı (%90,8) yeni olgu, 1.692’si (%9,2) tedavi görmüş olgudur. Akciğer tüberkülozu olan 12.813 hastadan 11.418’ne (%89,1) mikroskopi yapılmış ve akciğer tüberkülozlarından %63’ünde (8.073) yayma pozitif bulunmuştur. 2008 yılında, mikroskopi ve kültür yapıma oranları ile pozitiflik oranlarında 2007 yılındakine benzer sonuçlar alınmıştır. İlaç duyarlılık testi yapılan 4.931 hastanın %11,3’ünde en az bir ilaç direnci saptanırken, 383 hastada (%7,8) iki veya daha çok ilaca dirençli bulunmuştur. Ülkemizde TB’nin durumu değerlendirildiğinde, hastalık insidansı açısından başarılı kontrol programı uygulamış ülkelerle, kötü programlar uygulamış ülkeler arasında bir konumumuzun olduğu görülmektedir [16].

Mycobacterium tuberculosis kompleks’in neden olduğu TB hastalığı geri kalmış ülkelerde yaygın olarak görülmekte iken, TDM’lerin neden olduğu hastalıklar daha çok sanayileşmiş ülkelerde görülmektedir. Tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonu görülme sıklığı günümüzde değişim göstermiştir. Elli yıl önceki raporlara bakıldığında amfizem gibi altta yatan bir akciğer hastalığı olan yaşlı erkek hastalarda sık görülürken, artık TDM ile enfekte hastaların %80’ini yaşlı kadın hastalar oluşturmaktadır. Bunda kadınlarda sigara içme

oranındaki artışın rolü olsa da sigara içmeyen kadınlarda da TDM enfeksiyonları görülebilmektedir. Kadın hastaların çoğunda da bronşektazi gibi predispozan faktörler bulunmaktadır. Akciğer hastalığına neden olan TDM türlerinin dağılımı coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermektedir. *M. avium* kompleks bir çok bölgede baskın görülen türdür. *Mycobacterium kansasii* Orta Amerika ve İngiltere’de nispeten daha sık görülürken, *M. xenopi*’nin neden olduğu hastalıklar; Kuzey Amerika, İngiltere ve Avrupa’nın bazı bölgelerinde sık görülmektedir. *M. malmoense*’nin neden olduğu hastalıklar İngiltere ve Kuzey Avrupa’da yaygın görülürken, Amerika Birleşik Devletleri’nde nadirdir. Türkiye’nin Batı Anadolu Bölgesi’nde yapılan bir çalışmada ise; *M. avium* kompleks, *M. abscessus* ve *M. kansasii*’nin en sık görülen türler olduğu bulunmuştur. Çevresel koşullardaki (su ve toprak kaynakları) baskın TDM türleri bölgesel farklılıkların temelini oluşturmaktadır [17, 18].

Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) bildirilen TDM görülme sıklığı yüz binde 1-1,8 arasında değişmektedir. Fransa’da TDM’lerin neden olduğu pulmoner hastalık oranları 2002 yılı için yüz binde 0,73 olarak bulunmuştur. Sürveyans çalışmalarının kısıtlı olmasına rağmen, TDM enfeksiyonlarının tanımlamasındaki gelişmeler ve incelenen örnek sayısının artması nedeniyle bu oranların her yıl yükseldiği düşünülmektedir. Kişiden kişiye bulaş görülmediği için ABD’de TDM’ler rapor edilmemektedir [19, 20]. Tüberküloz dışı mikobakterilerin solunum örneklerinden izolasyonu son on yılda artmış ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında TB izolatlarından daha çok görülmeye başlamıştır. Kanada’da pulmoner örneklerden elde edilen TDM’lerin sıklığında 1997 yılından 2003 yılına kadar ortalama %8,4 artış saptanmıştır [21].

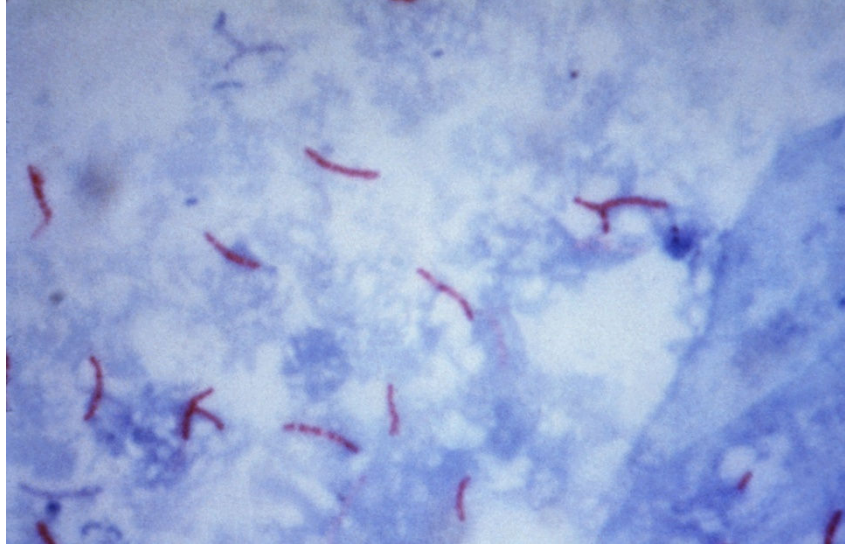
Çoğunlukla hızlı üreyen TDM’ler (*M. abscessus*, *M. fortuitum* ve *M. chelonae*) ile birlikte *M. avium* kompleks (MAK) ve *M. xenopi* nozokomiyal enfeksiyonlara neden olur. Genellikle immün yetmezliği olan insanlarda TDM’ler önemli akciğer hastalıklarına neden olurken, akciğer dışı nozokomiyal TDM enfeksiyonları günümüzde giderek artan sıklıkta rapor edilmektedir. Kardiyak cerrahide çeşitli cerrahi prosedürlerin uygulanması, enjeksiyonlar, plastik cerrahide kozmetik yüz cerrahisi girişimleri, “liposuction” uygulamaları ve “Laser-Assisted in Situ Keratomileusis” (Lazer eşlikli korneanın yerinde şekillendirilmesi) gibi invaziv oftalmik cerrahi girişimlerin uygulanması esnasında cilt ve yumuşak doku ile ilişkili TDM enfeksiyonları sık görülmektedir. Ayrıca kontamine bronkoskoplara bağlı TDM enfeksiyonları da saptanmaktadır. *M. gordonae* laboratuvarlarda kullanılan tamponlar ve su kaynaklarını kontamine ederek kültürlerde yalancı pozitifliklere neden olmaktadır. Hastane enfeksiyon kontrolünde çalışan hekimler, bu yalancı enfeksiyonları tanıyıp, kişilerin toksik ve pahalı antibiyotikler ile uygunsuz tedavi almalarını

önlemelidir [17, 22]. Hastane kaynaklı TDM enfeksiyonlarını önlemek için; fiber optik bronkoskopların manuel veya otomatik cihazlar ile temizliğinde çeşme suyu kullanmaktan kaçınılmalı ve alkolle son durulama mutlaka yapılmalı, ameliyathanelerde çeşme suyu ve/veya çeşme suyundan hazırlanmış buz kullanılmamalı ve açık yaralar çeşme suyu ile yıkanmamalı, hastalar balgam örneği vermeden önce çeşme suyu içmemeli veya ağızlarını çeşme suyu ile çalkalamamalıdır. *M. abscessus*'un üremesini engelleyemediği için, lokal enjeksiyonlar öncesi deri antiseptiği olarak benzalkoniyum klorid (zefiran) kullanılmamalıdır.

4.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Actinomycetales takımına ait *Mycobacteriaceae* ailesinin tek cinsi *Mycobacterium* cinsidir. Temel özellikleri arasında; sporsuz, hareketsiz ve aside dirençli olmaları, yavaş üremeleri, hücre duvarlarında bol miktarda lipit içermeleri sayılabilir. Mikobakteri türlerinin yüksek Guanin (G) + Sitozin (C) içerikleri (%61-71), diğer mikolik asit içeren *Gordonia* (%63-69), *Tsukamurella* (%68-74), *Nocardia* (%64-72) ve *Rhodococcus* (%63-73) mikroorganizmalar ile benzerlik göstermektedir [1].

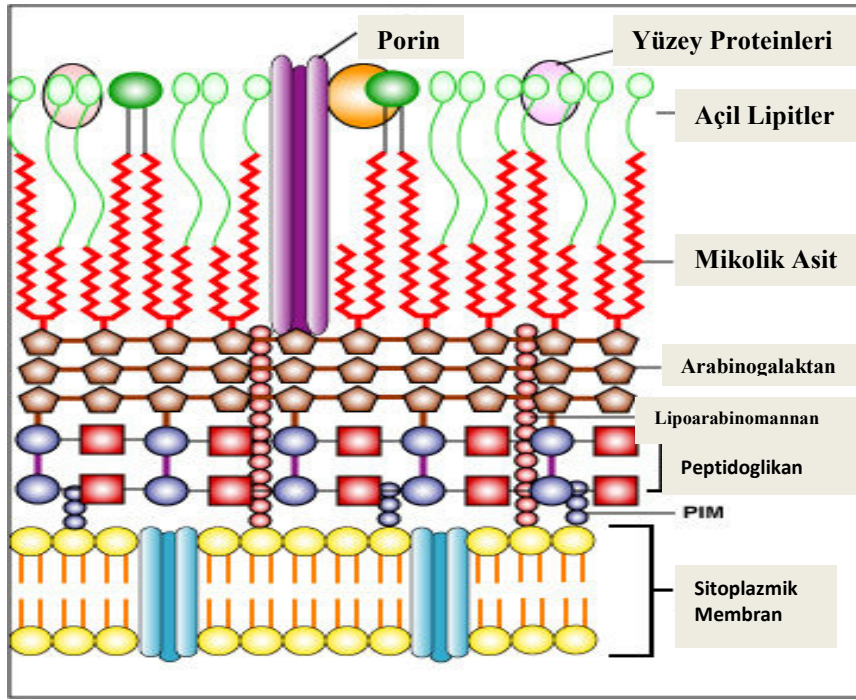
Gram negatif bakterilerden farklı olarak, mikobakteri hücre duvarının dış tabakalarında ek bir membran bulunmaz. Yapısal olarak gram pozitif bakterilere daha yakın olmasına rağmen, mikobakterilerin hücre duvarında protein ve polisakkaritler yerine özellikli lipitler yer almakta, bu nedenle gram pozitif kategorisine de uymamaktadır. Sıklıkla kristal viyoleyi tutamazlar ve gram boyamada hayalet hücreler şeklinde görülürler. Mikobakterilerin yüksek yağ içerikli hücre duvarı, fenol ile kombine edilmedikçe anilin ve diğer sık kullanılan boyalara geçirgen değildir. Ehrlich'in, TB basilinin aside dirençli oluşunu keşfetmesi ile patolojik örneklerde basilin belirlenmesinde çok büyük kolaylık sağlanmıştır. Aside dirençlilik; bazı mikroorganizmaların karbol fuksin gibi arilmetan boyaları ile boyandıktan sonra asit-alkol renksizleştirmesine direnç göstermesi olarak tanımlanır (Şekil 2).



Resim 2. Mikobakterilerin Erlich Ziehl Neelsen boyama görüntüsü [23].

Mikobakteriler; 0,2-0,6 μm eninde ve 1-10 μm boyunda, hareketsiz, kapsülsüz, ışık mikroskopunda düzgün ya da hafif kıvrık basiller şeklinde görölmektedir. Basilin büyüklüğü ve şekli, üreme koşulları ve kültürün süresine göre, kısa kokobasilden uzun basillere kadar değişiklik gösterebilir [24].

Mikobakterilerin hücre duvarı üç tabakadan oluşmuştur. Plazma zarının üzerinde bulunan iç tabaka peptidoglikandan (müreın) oluşmuştur. Bu tabaka kısa peptid zincirleri, çapraz bağlarla sıkıca bağlanan uzun polisakkarit zincirleri içerir ve hücrenin sert yapısını sağlar. Hücre duvarının %35'ini oluşturan ikinci tabaka arabinogalaktan, peptidoglikan tabakasına fosfodiester köprüleriyle bağlıdır (Şekil 3). Arabinogalaktanlara kovalent olarak bağlanan mikolik asitler, hücre duvar kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Mikolik asitler, trehaloz gibi şekerlere bağlanarak kord faktörü (6-6'-dimikolat- α -D-trehaloz) oluşturlar. En dış tabaka ise mikozidler olarak adlandırılan bir grup heterojen peptidoglikolipid ve/veya fenolik glikolipidden oluşmuştur. Hücre duvarında bulunan ve duvar ağırlığının %60'ını oluşturan lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitlerinden meydana gelmektedir. Bu lipidler; tüberkülostearik asit, mikoserik asit ve mikolik asitleri içerirler [25, 26].



Resim 3. Mikobakteri hücre duvarı

Mikobakterilerin lipid, protein ve polisakaritlerden oluşan antijenleri vardır. Bunlardan “*old tuberculin*” (OT), Robert Koch tarafından bulunan ve tüberkülin deri testinde kullanılan ısıya dayanıklı bir proteindir. OT’in saflaştırılması ile elde edilen PPD, DSÖ’nün de önerisiyle tüberkülin deri testinde kullanılmaktadır. Kord faktörü, bakterinin virulansı ile ilgilidir. Kültürden hazırlanan preparatlarda bakterinin demetler halinde bir arada bulunmasından sorumlu olduğu gibi, PNL migrasyonunu önleme ve granülom oluşumunu stimüle etme gibi fonksiyonlara da sahiptir. Sulfolipitler (trehaloz 2 sulfat), bakterinin hücre içinde canlı kalmasından ve kord faktörle sinerji oluşturmasından sorumludur. Isı şok proteinlerinin (65Kda, 38Kda, 12Kda), koruyucu immünite gelişmesinde ve komplikasyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir [27].

4.4 Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri nedeniyle birbiriyle yakın ilişkili olan türler “kompleks” başlığı altında gruplandırılır. “*Mycobacterium tuberculosis* kompleks” (MTK) içinde; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (*M. bovis* subs. *bovis*, *M. bovis* subs. *caprae* ve *M. bovis* subs. *BCG*), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii* ve *Mycobacterium pinnipedii* bulunmaktadır. *M. tuberculosis* kompleks dışında kalan tüm mikobakteriler TDM olarak adlandırılmaktadır [1, 28].

Tüberküloz dışı mikobakterilerin; a) fakültatif patojen olmaları, b) insandan insana geçişi konusunda yeterli kanıt olmaması, c) türüne ve neden olduğu hastalığa bağlı olarak

tedavilerinin zor ve farklı olması, d) mikroorganizma ve konağın immün sistemi arasındaki ilişkiye bağlı olduğu düşünülen hastalık patogenezinin belirsizliği ortak özellikleridir [29].

Ernest Runyon; TDM'leri üreme hızları, koloni morfolojileri ve pigment üretimlerine göre fotokromojenler, skotokromojenler, fotokromojen olmayanlar ve hızlı üreyenler olarak 4 grupta sınıflandırmıştır (Tablo 1) [28]. Grup I, II, III' ün kolonileri gözle görülür hale gelebilmesi için 7 gün veya daha fazla süreye ihtiyaç gösterirken, Grup IV' ün kolonileri 7 günden daha kısa sürede üremektedir [30].

Tablo 1. Runyon sınıflaması

		Pigment Üretme		
Grup	Üreme Hızı	Işıktaki	Karanlıkta	Örnek Türler
I - Fotokromojenler	Yavaş	+	-	<i>Mycobacterium kansasii</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> , <i>Mycobacterium simiae</i>
II - Skotokromojenler	Yavaş	+	+	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , <i>Mycobacterium szulgai</i> , <i>Mycobacterium gordonae</i>
III-Fotokromojen olmayanlar	Yavaş	-	-	<i>Mycobacterium malmoeense</i> , <i>Mycobacterium xenopi</i> , <i>Mycobacterium avium</i> kompleks, <i>Mycobacterium ulcerans</i> , <i>Mycobacterium haemophilum</i>
IV - Hızlı Üreyenler	Hızlı	-	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium chelonae</i> , <i>Mycobacterium abscessus</i>

Runyon sınıflaması mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bazı türlerin tanımlanmasında güçlüklerle karşılaşmaktadır. Örneğin klinik önemi son yıllarda ortaya çıkan *Mycobacterium kansasii*, genellikle fotokromojen olmakla birlikte, bazı suşlarının pigment oluşturmaması ve hatta skotokromojen olması, yine bazı *M. avium-intracellulare* suşlarının pigment yapması, *Mycobacterium szulgai*'nin 37°C'de skotokromojen, 25°C'de fotokromojen olması Runyon sınıflamasına uymamaktadır. Bu

kısıtlamalara rağmen klinik mikrobiyoloji laboratuvarları TDM'lerin ön tanımlamasında bu sınıflamadan yararlanmaktadır. Woods ve Washington 1987 yılında TDM'leri; insanda potansiyel patojen olanlar ve nadiren hastalık yapan saprofit mikobakteriler olarak sınıflamıştır (Tablo 2) [31, 32].

Tablo 2. Woods ve Washington sınıflaması

İnsanda potansiyel patojen olanlar		<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> , <i>Mycobacterium kansasii</i> , <i>Mycobacterium fortuitum-chelonae</i> kompleks, <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , <i>Mycobacterium xenopi</i> , <i>Mycobacterium szulgai</i> , <i>Mycobacterium malmoense</i> , <i>Mycobacterium simiae</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> , <i>Mycobacterium ulcerans</i> , <i>Mycobacterium haemophilum</i>
Nadiren Hastalık Yapan Saprofit Mikobakteriler	Yavaş Üreyenler	<i>Mycobacterium gordonae</i> , <i>Mycobacterium asiaticum</i> , <i>Mycobacterium terrae-triviale</i> , <i>Mycobacterium gastri</i> , <i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> , <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>
	Hızlı Üreyenler	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Mycobacterium vaccae</i> , <i>Mycobacterium parafortuitum</i> kompleks, <i>Mycobacterium phlei</i>
	Orta Hızda Üreyenler	<i>Mycobacterium flavescens</i>

Günümüzde TDM sınıflandırması ise mikobakterilerin öncelikle enfeksiyon oluşturdıkları organ bazında yapılmaktadır. Buna göre; akciğer tutulumundan en sık *M. avium* kompleks (MAK) ve *M. kansasii* sorumlu bulunurken *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. celatum*, *M. asiaticum* da daha nadir etkenler arasında sayılabilir. Akciğer dışında ise; çocuklarda görülen lenf nodu tutulumundan MAK, *M. scrofulaceum* ve *M. malmoense*; deri tutulumundan genellikle *M. marinum*, *M. ulcerans* ve hızlı üreyen mikobakteriler; kemik eklem tutulumundan ise *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* ve *M. kansasii* sorumlu bulunmuştur. Solid organ transplantasyonu, kronik kortikosteroid kullanımı, kollajen vasküler hastalık, lösemi, lenfoma gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda sık

görülen yaygın TDM enfeksiyonlarında ise patojen suşlar MAK, *M. kansasii*, *M. chelonae* ve *M. haemophilium*'dur. TDM'lerin, nadir olarak prostetik kalp kapak enfeksiyonları ve genitoüriner enfeksiyonlara da neden olduğu bildirilmektedir [33].

4.5 Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Tanısı

Tüberküloz dışı mikobakterilerin neden olduğu akciğer hastalıklarının tanısında 2007 yılında Amerikan Toraks Derneği tarafından klinik ve mikrobiyolojik kriterler belirlenmiştir.

Klinik olarak;

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

Mikrobiyolojik olarak;

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

Klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik kriterlerin her biri, TDM'ye bağlı akciğer hastalığı tanısı konulmasında eşit derecede önemlidir ve tanının konulması için tümünün

uyumlu olması gerekir. Bu kriterler en çok *M. avium* kompleks (MAC), *M. kansasii* ve *M. abscessus* ' un neden olduğu akciğer hastalıklarına uymaktadır [20].

4.6 Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı

Tüberküloz dışı mikobakteri türlerinin doğru ve güvenilir olarak tanısının konulabilmesi ve epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesi için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek kısa sürede sonuç veren tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır [34]. Bu amaçla hızlı kültür sistemleri ve moleküler yöntemler geliştirilmiştir.

4.6.1 Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Mikobakterilerin mikrobiyolojik tanısının tam ve doğru olarak yapılabilmesi için klinik örnek uygun yerden, doğru zamanda ve yeterli miktarda alınmalı, uygun laboratuvar koşullarında işlenmelidir. Hastalık çok çeşitli organ ve dokuları tutabildiğinden örnek seçimine özen gösterilmelidir. Mikobakteriyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerin çoğunluğu solunum sistemi kaynaklı (ekspektore veya indüklenmiş balgam, açlık mide sıvısı, bronkoalveoler lavaj, transtrakeal aspirasyon, bronşial fırçalama ve laringeal sürüntü örnekleri) olmakta, idrar, gastrik aspiratlar, dokular, biyopsi örnekleri ile beyin omurilik sıvısı, plevral ve perikardial aspiratlar gibi normalde steril olan vücut sıvıları diğer örnekleri oluşturmaktadır. Kan ve dışkı örnekleri ise genellikle immun sistemi baskılanmış hastalardan gönderilmektedir [35].

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

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

Bu amaçla en çok NALC ve NaOH yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde; NALC mukolitik, NaOH dekontaminan ve sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal

iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin hacmine eşit miktarda NALC-NaOH eklenip vorteks ile iyice karışması sağlandıktan sonra 15 dakika beklenmektedir. Bu süre sonunda fosfat tamponu ile nötralizasyon sağlanmaktadır. Konsantre etmek amacıyla uygulanan santrifüj sonrası elde edilen çökeltiden preparatlar hazırlanmakta ve uygun besiyerlerine ekimleri yapılmaktadır [1, 36]. Kistik fibrozis ya da bronşektazili hastaların, aerop gram negatif basiller, özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ile kontamine örneklerinde NALC-NaOH ve %5'lik oksalik asit yöntemi beraber kullanılmaktadır. Özellikle hızlı üreyen mikobakteriler olmak üzere TDM'ler dekontaminasyon prosedürlerine MTK'den daha duyarlıdır. Bu yüzden kullanılan yöntem bu mikobakterileri ortadan kaldıracak kadar ağır olmamalıdır. Ayrıca TDM şüpheli örneklerde oksalik asit dekontaminasyon yöntemi uygulanması, TDM'lerin kültürde üretilme şansını azaltmaktadır [20].

4.6.2 Mikroskopik inceleme

En kolay, en ucuz ve en sık kullanılan yöntemdir. Yaymada ARB saptanması, klinik örnekte mikobakteri varlığını gösteren ilk bakteriyolojik kanıttır. Mikroskopik incelemede, aside dirençli bakteri görülmesi için örnekte 5.000-10.000 basil/mL bulunması gereklidir. Günümüzde halen balgam ve diğer klinik örneklerden yayma ile ARB aranması ve bunun kültür ile doğrulanması TB tanısında altın standarttır. Mikobakteriler için başlıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir [37, 38].

1.Karbolfuksin boyama:

- Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN)
- Kinyoun

2.Florokrom boyama:

- Auramine O
- Auramine-Rhodamine

Bu iki boyama yöntemi ile hazırlanan yaymaların raporlanmasında farklı değerlendirme ve kriterler kullanılmaktadır. En yaygın olarak, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 3) [39].

Tablo 3. Karbolfuksin ve florokrom yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi ve sonuçların bildirilmesi

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

Mikroskopik incelemenin duyarlılığı %22-80 arasında değişkenlik göstermektedir. Duyarlılığı etkileyen faktörler arasında; incelenen örneğin türü, santrifüjleme hızı, boyama tekniği, değerlendiren kişinin deneyimi, kullanılan kültür yöntemi ve değerlendirilen hasta popülasyonu sayılabilir. Mikobakterilerin aranmasında mikroskopik incelemenin özgülüğü ise çok yüksektir [40].

4.6.3 Kültür yöntemleri

Tüberküloz dışı mikobakterilerin kesin tanısı basilin kültürde üretilmesi ile konur. Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen, tür düzeyinde tanımlama işlemleri için gerekli izolatların elde edilebilmesine, bakterilerin canlılıklarının doğrudan gösterilebilmesine, ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastaların doğru tedavi edilebilmesine, çoğaltılan izolatların daha sonraki araştırmacılar için saklanabilmesine ve epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesine imkan sağlamaları açısından mikobakterilerin tanısında halen altın standart olmaya devam etmektedir. Aside dirençli basillerin kültürde üretilmesi için örneğin her ml'sinde 10-100 canlı basil olması yeterlidir [41]. Mikobakterilerin üremeleri için özel besiyerlerine gereksinimleri vardır. Bu besiyerleri kompleks yapıda olup, katı besiyerleri ve mikobakterilerin daha kısa sürede üremelerine imkan sağlayan sıvı besiyerlerinden oluşur.

A-Katı Besiyerleri

1-Yumurta Bazlı

- Löwenstein-Jensen(LJ)
- Petragnani
- American Thorasic Society
- Trudeau

2-Agar Bazlı

- Middlebrook 7H10
- Middlebrook 7H11

B-Sıvı Besiyerleri

- Middlebrook 7H9
- Dubos Tween albümin

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) mikobakterilerin birincil izolasyonunda klasik katı besiyerleri yanı sıra sıvı besiyerlerinin de birlikte kullanılmasını, önermektedir [42].

Kontaminant mikroorganizma üremelerinin baskılanması amacıyla, katı besiyerlerine çeşitli antimikrobiyal maddelerin eklenmesi ile hazırlanan seçici besiyerleri de mevcuttur. Bunlar arasında; sikloheksimid, nalidiksik asit ve linkomisin içeren mycobactosel L-J besiyeri, penisilin ve nalidiksik asit içeren L-J Gruft besiyeri, karbenisilin, polimiksin B, trimetoprim laktat ve amfoterisin B içeren mitchison'un seçici 7H11 (7H11S) besiyeri sayılabilir [43].

Günümüzde özellikle ilk izolasyonda, tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle yumurta bazlı besiyeri olan Löwenstein-Jensen besiyeri (LJ) yaygın olarak kullanılmaktadır. Yumurta bazlı besiyerlerinin; iyi bir tampon kapasitesine, uzun raf ömürlerine (buzdolabında birkaç ay) sahip olmaları ve çoğu mikobakterinin iyi üremesini desteklemeleri önemli avantajlarıdır. Ancak koloni oluşumunun erken dönemde saptanamaması (18-24 günde görülebilmekte), duyarlılık testleri için konsantrasyon ayarının yapılamaması dezavantajlarıdır.

Yumurta bazlı besiyerlerinin opak görünümlü olmasına karşın, agar bazlı besiyerleri şeffaftır. CLSI duyarlılık testleri için agar bazlı besiyerlerini önermektedir. Ancak pahalı ve raf ömürlerinin nispeten kısa olması (buzdolabında bir ay kadar) önemli dezavantajlarıdır [43].

Sıvı besiyerleri; mikobakterilerin primer izolasyonu, stok suşların pasajlarının yapılması, ilaç duyarlılık testleri ve diğer in vitro testler için inokulum hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle Middlebrook 7H9, bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakteriyi çoğaltmak ve dolayısıyla izolasyon şansını artırmak amacıyla kullanılmaktadır [44].

Bazı TDM türleri kültür ortamında üreyebilmek için özel ek maddelere ihtiyaç duymaktadır. Örneğin *Mycobacterium haemophilum*'un üretilmesi için ferrik amonyum sitrat, hemin veya hemoglobin gibi demir içeren bileşiklerin eklendiği besiyerleri, *M. ulcerans* için yumurta sarılı besiyerleri, *M. genavense* ve *M. avium* subsp. *paratuberculosis* için de mikobaktin J eklenmiş besiyerleri kullanılmalıdır [20].

Klasik kültür yöntemleri dışında hızlı sonuç veren kültür yöntemleri de mikobakterilerin tanısında kullanılan rutin yöntemler arasında yer almaktadır. Bu yöntemlerde zengin içerikli besiyerleri kullanılarak hem mikobakterilerin izolasyon şansı arttırılmakta hem de mikobakterilerin üremesi erken dönemde sağlanmaktadır. Bu sistemler arasında, radyometrik sistem BACTEC 460 TB, bifazik sistem Septi-check AFB sistemi, kolorimetrik sistem BacT/ALERT sistemi, karbondioksit oluşumunu saptayan sistem ESP MYCO sistemi, floresans ile değerlendirilen sistem Mycobacteria Growth Indicator Tube, TK kültür sistemi ve manuel sistemler MB-Redoks sayılabilir [45].

Tüberküloz dışı mikobakteri kültürleri için en uygun sıcaklık 28°C ile 37°C arasındır. Klinik yönden önemli olan yavaş üreyen mikobakteri türleri genellikle 35°C - 37°C arasını tercih ederken, istisna olarak *Mycobacterium haemophilum* 28°C - 30°C, *M. ulcerans* 25°C - 33°C, *M. chelonae* 28°C - 33°C arasında iyi üremektedir. Hızlı üreyen mikobakteriler ve *M. marinum* ise 28°C - 30°C dereceleri arasında iyi üremektedir. Bu yüzden mikobakterileri üretebilme şansını arttırmak için iki ayrı besiyeri setine ekim yapılmalı biri 28°C - 30°C diğeri de 35°C - 37°C arasında inkübasyona tabi tutulmalıdır. Tüberküloz dışı mikobakterilerin çoğu 2-3 hafta içinde kültürde üremektedir. Hızlı üreyen mikobakteriler genellikle 7 gün içinde ürerken, *M. genavense* ve *M. ulcerans*'ın üremesi için 8 - 12 hafta gerekmektedir. Mikobakterilerin üreme zamanı TDM'lerin ayırımında önemli olduğu için mutlaka kaydedilmelidir [20].

4.6.3.1 BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Biosciences)

Uzun yıllardır izolasyon, tanımlama ve duyarlılık testlerinin uygulandığı yarı otomatize radyometrik bir sistemdir. Bu sistemde kullanılan BACTEC 12B besiyeri, ¹⁴C işaretli palmitik asit içerir. Mikobakterilerin ¹⁴C işaretli palmitik asit kullanımı sonucu ¹⁴CO₂

oluşur ve sistem belli aralıklarla $^{14}\text{CO}_2$ miktarını ölçerek mikobakterilerin varlığını bir üreme indeksi (growth index: GI) olarak gösterir. Ekim işleminden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı, kontaminant mikroorganizmaların üremesini engellemek için ilave edilmelidir. BACTEC 12B besiyerinin radyoaktif madde içermesi, çapraz kontaminasyon, enjektörlerin yaygın kullanımı sonucu oluşan laboratuvar kazaları sistemin dezavantajlarını oluşturmaktadır.

4.6.3.2 MGIT 960 (Becton Dickinson, Biosciences)

Tam otomatize ve radyometrik olmayan bir sistemdir. MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunmaktadır. Floresan madde, sıvı besiyerindeki oksijen varlığında maskelenmektedir. Üreyen mikobakterilerce oksijenin tüketilmesi sonucu açığa çıkan floresans, mikobakterilerin varlığını gösterir. MGIT 960 duyarlılığı, BACTEC 460 TB'ye benzer. Ancak kontaminasyon oranları daha yüksektir. MGIT 960'ın BACTEC 460 TB'den en önemli avantajları; çapraz kontaminasyon olasılığının düşük olması, enjektör ile inokulasyona ihtiyaç duyulmaması ve radyoizotop içermemesidir. Yüksek kontaminasyon oranları ve kan ile floresanın maskelenmesi, MGIT 960'ın dezavantajlarıdır [43, 46, 47].

4.7 Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Tanımlanması

Tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonlarına özgü klinik bulgular olmadığı için, kesin tanı mikrobiyolojik inceleme ile konmaktadır. Bu mikroorganizmalar tanımlanırken hem fenotipik, hem de genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır. Mikobakterilerin tanımlanmasında 1980'li yıllara kadar fenotipik özellikli testler yaygın olarak kullanırken, günümüze kadar olan süreçte moleküler yöntemlerdeki ilerlemenin etkisiyle genotipik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır [34].

4.7.1 Fenotipik Testler

Tüberküloz dışı mikobakteriler; öncelikle üreme süreleri, üreme ısıları, koloni görünüşleri ve pigment oluşturma özelliklerine göre gruplandırılır. Bu gruplama sonunda tanımlanacak olan mikobakteriler için çok sayıda biyokimyasal testler uygulanmaktadır. Bunlar arasında; arilsülfataz, katalaz, niasin akümülyasyon testi, prazinamidaz ve üreaz üretimi, sodyum klorür toleransı, tiofen-2 karboksilik asit hidrazid ile üremenin inhibe edilmesi, nitrat ve tellürit redüksiyonu, tween 80 hidrolizi sayılabilir (Tablo 4).

Katalaz testi: *M. tuberculosis*, *M. gastri* ve *M. kansasii*'yi diğer mikobakterilerden ayırt edebilmek amacıyla kullanılır. Tüm mikobakteriler katalaz deneyi ile olumlu sonuç

verirken, bu üç mikobakteri türü olumsuz sonuç vermektedir. Katalaz aktivitesini saptamak için biri semikantitatif test ve diğeri ısı tolerans testi olmak üzere iki test kullanılır. Semikantitatif test mikobakterileri, hava kabarcıklarının yüksekliğinin <45mm veya >45mm olmasına göre değerlendirilerek düşük ve yüksek katalaz reaksiyonu oluşturanlar olmak üzere iki gruba ayırır. Isı tolerans testinde ise, katalaz enziminin bazı formları 68°C de 20 dakika ısıtıldığında inaktive olur. Enzimin ısı ile inaktivasyonu bazı mikobakteri türlerinin ayırt edilmesinde tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılan hidrojen peroksit, diğer bakterilerde bulunan enzimin araştırılmasında kullanılan ayıraçtan farklıdır. Hidrofobik ve kümeli olan mikobakterilerin dağılmasını ve enzimin kolayca açığa çıkmasını sağlamak için testte %30 H₂O₂ ile güçlü bir deterjan olan %10 Tween-80'nin karışımı kullanılır [48].

Niasin testi: Bu testin temeli, *M. tuberculosis* ile *M. simiae* ve *M. chelonae* izolatlarının nikotinik asiti diğer mikobakterilere göre daha az metabolize etmeleri sonucu, besiyerine niasin salmaları ve bu niasinin çeşitli kimyasallarla saptanması esasına dayanmaktadır.

Tiofen-2 karboksilik asit hidrazid (T2H) testi: T2H ile üremenin inhibe edilmesi, niasin pozitif *Mycobacterium bovis*'i, *M. tuberculosis* ve diğer non kromojenik yavaş üreyen mikobakterilerden ayırmak amacıyla kullanılır. *M. tuberculosis* ve yavaş üreyen mikobakterilerin çoğu içinde T2H bulunan Middlebrook besiyerinde ürerken, *M. bovis* bu besiyerinde üreyemez.

Pirazinamidaz testi: Pirazinamidaz enzimi pirazinamidi (PZA) pirazinoik asit ve amonyağa hidrolize eder ve ortaya çıkan pirazinoik asit, besiyerine ferröz amonyum sülfat eklenmesi ile saptanabilir. Bu test ile *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare* ve *M. marinum* pozitif sonuç veririrken, *M. bovis* ile *M. kansasii* negatif sonuç vermektedir.

MacConkey agarda üreme testi: *M. fortuitum* ile *M. chelonae*'nin diğer mikobakterilerden ayrılmasını sağlar. Sadece bu iki mikobakteri türü MacConkey agarda üreme gösterirler.

Üreaz testi: Bir izolatın üreyi amonyak ve CO₂ e çevirebilme özelliği skotokromojen ve kromojen olmayanların tanımlanmasında faydalıdır. *Mycobacterium scrofulaceum* üreaz pozitifken *M. avium* ve *M. intracellulare* üreaz negatiftir. Üreaz testi özellikle pigment yapan *M. avium* suşlarının tanımlanmasında yardımcıdır.

Tween 80 hidroliz testi: Bazı mikobakteriyel türler tarafından üretilen lipazlar “polyoxyethylene sorbitan monooleate” (Tween 80) deterjanı hidrolize ederek oleik asit ve “polyoxyet-hylene sorbitol” açığa çıkar. pH'sı 7 olan test besiyeri içindeki nötral kırmızısı

Tween 80 tarafından bağlanır ve nötral pH’da kehribar rengindedir. Eğer Tween 80 hidrolize edilirse nötral kırmızısı artık bağlı değildir ve pH 7’de kırmızı renge döner. Tween 80 hidroliz testi yavaş üreyen TDM türleri arasında ayırım için kullanılır.

Nitrat redüksiyon testi: Mikobakteriler nitroredüktaz enzimi üreterek nitratları nitritlere indirgeyebilirler. Nitrat redüksiyonu testi; koloni morfolojisi, üreme hızı ve pigment üretme özellikleri birbirine benzer olan mikobakterileri ayırt etmede değerlidir. *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, bazı saprofit nonkromojenler, *M. smegmatis* ve *M. fortuitum* grubu nitrat redüktaz pozitifdir.

Sodyum klorür tolerans testi: %5’ lik NaCl içeren LJ besiyerinde üreyebilme yeteneği, 28°C’de inkübe edildikleri zaman, yavaş üreyenlerden sadece *Mycobacterium trivale*, *M. flavescens*’in bazı suşları, *M. abscessus* ve *M. fortuitum* için ortak özelliktir [48].

Suşların MTK ve TDM olarak ayırımında sınırlı bir identifikasyon sağlayan bazı kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bunlar arasında; p-nitrobenzoat, hidroksilamin hidroklorür, azaguanin, nitroksolin ve NAP (p-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropionophenone) sayılabilir. BACTEC 460 TB sisteminde NAP, MGIT 960 sisteminde p-NBA (paranitrobenzoik asit) kullanılarak MTK ve TDM ayırımı yapılabilmektedir [49].

Tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan bu biyokimyasal testler sadece belli türleri birbirinden ayırt edebilmektedir. Tanımlamanın yapılabilmesi için de bu testlerin çoğunun bir arada uygulanması gerekmektedir. Mikobakterilerin üreme özelliklerinin belirlenmesi ve geleneksel biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması yaklaşık 3-6 hafta, hatta bazen daha uzun sürebilmektedir. Biyokimyasal testler zahmetli ve uzun zaman gerektirdiği için günümüzde sadece birkaç test MTK ve TDM ayırımı için kullanılmaktadır [34, 48].

Tablo 4. Mikobakterilerin tanımlamasında kullanılan biyokimyasal özellikler

Tür	Optimal Sıcaklık °C	Niasin	TCHde Üreme	Nitrat redüksiyonu	Semikant. katalaz >45min	68°C katalaz	Tween hidroli 5 günlük	Tellürit redüksiyonu	%5 NaCl tolerans	Demir alımı	Amisülfataz 3 günlük	McConkey agarda üreme	Üreaz	Pirazinamidaz 4 günlük
<i>M. tuberculosis</i>	37	+	+	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	+
<i>M. bovis</i>	37	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-
<i>M. africanum</i>	37	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. marinum</i>	30	±	+	-	-	-	+	±	-	-	±	-	+	+
<i>M. kansasii</i>	37	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	+	-
<i>M. smitiae</i>	37	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>M. asiaticum</i>	37	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	37	-	+	-	+	+	-	±	-	-	D	-	D	±
<i>M. szulgai</i>	37	-	+	+	+	+	±	±	-	-	D	-	+	+
<i>M. goodii</i>	37	-	+	-	+	+	+	-	-	-	D	-	D	±
MAC	37	-	+	-	-	±	-	+	-	-	-	±	-	+
<i>M. genavense</i>	37	-	+	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+
<i>M. gastri</i>	37	-	+	-	-	-	+	±	-	-	-	-	±	-
<i>M. malmoense</i>	37	-	+	-	-	±	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>M. haemophilum</i>	30	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. shinoides</i>	37	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. ulcerans</i>	30	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. flavescens</i>	37	-	+	+	+	+	+	±	+	-	-	-	+	+
<i>M. xenopi</i>	42	-	+	-	-	+	-	±	-	-	±	-	-	D
<i>M. terrae</i> kompleks	37	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	D	-	D
<i>M. fortuitum</i> grup		±	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. chelonae</i>		D	-	-	+	D	D	+	-	-	+	+	+	+
<i>M. abscessus</i>		D	-	-	+	D	D	+	+	-	+	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>				+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

4.7.2 Moleküler Testler

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

4.7.2.1 DNA Dizi Analizi

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

16S rRNA geni, bütün bakterilerde çok iyi şekilde korunmuş olması ve türe özgü değişen diziler içermesi nedeniyle bakterilerin moleküler tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilen bir hedef bölgedir.

16S rRNA dizi analizi, çoğu mikobakteri türünün tanımlanmasını sağlamasına rağmen, *M. tuberculosis* kompleks üyelerini ayırt edemez. Benzer olarak önemli bir patojen olan *Mycobacterium kansasii* ile patojenik olmayan *M. gastri*, *M. marinum* ile *M. ulcerans*’ ın ve *M. malmoense* ile *M. szulgai*’ nin dizi analizi aynıdır. Bunların ayırt edilmesi için ek bölgelerin dizi analizi gerekmektedir [50, 51].

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

4.7.2.2 Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri

DNA prob Teknolojileri: Bazı TDM türlerinin tanımlamasında 16S rRNA’yı hedef alan akrیدیum ester işaretli DNA proplar yaygın olarak kullanılmaktadır. AccuProbe (Gen-Probe Inc, San Diego, CA) ticari kitleri ile, MTK, MAK, *M. kansasii* ve *M. gordonae* hızlı şekilde tanımlanmaktadır. Kolay uygulanan bir yöntem olmasına rağmen, DNA problemlerinin dezavantajları; MTK ile *Mycobacterium celatum* tip 1 ve 3 arasında çapraz reaksiyon görülebilmesi, sonikatör ve luminometre gibi cihazlara ihtiyaç duyulmasıdır [52].

Line prob Teknolojileri: Son zamanlarda TDM’lerin tanımlanmasında “*internal transcribed spacer*” (ITS) gen bölgesini hedef alan INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics N.V., Zwijndrecht, Belgium) ve 23S rRNA genini hedef alan GenoType Mycobacteria CM/AS (CM, common mycobacteria; AS, additional species), (Hain Lifescience GmbH, Nehren Germany) ters hibridizasyon testleri rutin olarak kullanılmaktadır.

INNO-LiPA Mycobacteria v2 ile tek basamakta 16 farklı mikobakteri türü (*M. tuberculosis* kompleks, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae* grup, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. fortuitum-peregrinum* kompleks, *M. smegmatis*) tanımlanabilmektedir. GenoType Mycobacteria yönteminde ise tanımlanması istenen mikobakteri izolatu önce daha sık görülen mikobakteri türlerinin saptandığı GenoType Mycobacteria CM testiyle değerlendirilir, bu testle tanımlanamayan mikobakteriler ise genellikle daha az görülen mikobakteri türlerini saptayan GenoType Mycobacteria AS testi ile tanımlanmaktadır. GenoType Mycobacteria CM/AS ile; *Mycobacterium avium* subspecies, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*-*M. ulcerans*, *M. peregrinum*, *M. tuberculosis* kompleks, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. cellatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. hemophilum*, *M.*

kansasii, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, ve *M. shimoidei* tanımlanabilmektedir. Bu testler hızlı uygulanmakta ve kolay bir şekilde yorumlanmaktadır [50, 53, 54].

4.7.2.3 PZT-Restriksiyon Enzim Analizi Yöntemi (PRA)

Plikaytis ve arkadaşları tarafından 1992 yılında, mikobakterilerin hızlı bir şekilde tanımlanması için *PCR-REA* (Restriksiyon enzim analizi) (PRA) ve diğer ismi *PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)* olan yöntem geliştirilmiştir. Bu teknik; tüm mikobakterilerde bulunan “*heat shock protein*” (hsp65) gen bölgelerini hedef alan PZT, daha sonra ampliconların restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elde edilen ürünlerin elektroforezi aşamalarından oluşmaktadır. Hibridizasyon basamakları ve radyoaktivite içermeyen bu yöntem ile elde edilen paternler tür saptama cetveline göre analiz edilerek, kısa sürede sonuç vermektedir [55, 56].

Restriksiyon endonükleaz enzimleri (RE); kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA’yı kesen enzimlerdir. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin büyük bir kısmı bakteriler bir kısmı virüsler ve ökaryotik canlılar tarafından sentezlenmektedir. Bu enzimler metilaz aktivitelere, alt ünite yapılarına, kesim özgüllüklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre, tip I, II, III ve homing endonükleazlar olarak 4 genel grupta sınıflandırılmaktadır. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin özelliklerinden en dikkate değer olanı, bu enzimlerin optimal şartlarda özgül DNA’yı en yakın dizilimden kesebilme başarılarının optimal olmayan şartlarda oldukça değişmesidir. Örneğin; *EcoRI* enziminin tanıma bölgesi (5’-GAATTC-3’)’ne bağlanma oranı en yakın tanıma bölgesi (5’-TAATTC-3’)’ne kıyasla 10^5 kat daha fazladır. Ancak, enzim için optimal olmayan şartlar altında bu oran oldukça değişmektedir. Enzimlerin benzer bölgeleri kesme işlemine, bir enzimin star aktivitesi denilmektedir. Kullanılan enzimlerin star aktiviteye sahip olup olmadıklarının bilinmesi moleküler çalışmaların başarısı açısından önemlidir [57].

4.7.2.4 “*Single-stranded conformation polymorphism*” (SSCP) yöntemi

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

16S rRNA geninin PZT ile çoğaltılmış parçalarının SSCP analizi, bakteri türlerinin tanımlanmasında da kullanılmaktadır.

Mikobakteri türlerinin tanımlanmasına yönelik olarak geliştirilmiş olan SSCP yönteminde, mikobakteriyel 16S rRNA geninin değişken bölgelerine özgül dört ayrı çift iplikçikli parça, dört çift floresan primer ile çoğaltılmakta ve elde edilen ürünlerin SSCP analizi yapılmaktadır. Bu yöntemle PZT sonrasında SSCP analizi sonucu 30 dakika içinde alınabilmekte, kapiller elektroforez sistemi sayesinde aynı anda 16 örnek test edilebilmektedir. Hızlı ve özgül bir yöntemdir [34, 58].

4.7.2.5 “DNA microarray”

“DNA microarray” çok sayıdaki DNA dizilerinin hızlı bir şekilde incelenmesini sağlayan yöntemdir. PZT ile elde edilen ampikonların, çok sayıda farklı oligonukleotid prob içeren minyatür analitik araçlar üzerinde “DNA chip” kendine uyan prob ile hibridize olması sonrasında ortama yayılan floresan sinyallerin bir tarayıcı tarafından saptanması esasına göre mikobakterileri tür düzeyinde tanımlamaktadır. Aynı zamanda *M. tuberculosis*’ in RIF direncine yol açan *rpo* β gen mutasyonlarının belirlenmesinde de kullanılabilir. Testin ortalama sonuçlanma süresi 4 saattir. Bu yöntemin en olumsuz yanı pahalı olmasıdır [59].

4.7.3 Mikolik Asit Analizi

Mikolik asitler mikobakteri hücre duvarının önemli bir kısmını oluşturan uzun zincirli β -hidroksi yağ asitleridir. Her mikobakteri türünde farklı fonksiyonel gruplar ve farklı karbon sayılı mikolik asitler bulunmaktadır. Türe özgü bu farklılıklar nedeniyle mikolik asit analizi mikobakteri türlerinin tanımlanmasında önemlidir. Bu amaçla “thin-layer chromatography” (TLC), “high-performance liquid chromatography” (HPLC) ve “gas-liquid chromatography” (GLC) teknikleri kullanılmaktadır. Mikolik asit analizi; pahalı ekipman ve yüksek maliyet gerektirmesi nedeniyle yalnızca referans laboratuvarları tarafından kullanılması önerilmektedir [60].

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Çalışma Grubu

2004-2010 yılları arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında, solunum yolları örneklerinden soyutlanan 156 adet TDM izolatu ve kalite kontrol suşları [*M. intracellulare* tip 1 (ATCC 13950), *M. abscessus* tip 1 (ATCC 19977), *M. fortuitum* tip 1 (ATCC 6841), *M. gordonae* tip 1 (ATCC 14470), *M. scrofulaceum* tip 1 (ATCC 19981), *M. szulgai* (ATCC 35799), *M. kansasii* tip 1 (ATCC 12478) ve H37Rv] çalışmaya alındı.

5.2 Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin, LJ Besiyerinde üretilmesi

2004-2009 yılları arasında, Mikobakteriyoloji Laboratuvarında TDM olarak tanımlanmış örneklerle ait BACTEC 12B şişelerinden 0,5 ml alınıp, LJ besiyerine ekim yapıldı. Üremeler kontrol edilerek, üreme zamanları not edildi. 2010 yılına ait örnekler ise rutinde üreyen besiyerlerinden alınarak işlemlendi.

5.3 Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Moleküler Tiplendirilmesi

Tüberküloz dışı mikobakterilerin; DNA izolasyonu ve hsp65 gen bölgelerine yönelik PRA yöntemi ile tiplendirilmeleri, uluslararası, standardize edilmiş protokollerle yapıldı.

5.3.1 Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin DNA İzolasyonu

Gereçler:

1. EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) stok solüsyonu (0,5M)

Na₂EDTA (Sigma E5134) 18,6 g

Na₂EDTA yı 90 ml distile suda eritildi

pH'ı (pH:8.0) ayarlamak için 2 g NaOH ilave edildi.

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı

Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı

2. Tris-EDTA (1X TE) pH=8

Tris-HCL (Sigma T5941) 1,576 g

500 mM EDTA 2 mL

Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı

Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı

Yöntem:

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

BACTEC 12B ve MGIT şişelerinden steril enjektörler yardımıyla 1 mL vidalı kapaklı epandorflara alındı. 11.000 g de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım atıldı.

2. Çökelti üzerine 250 µL 1X TE tamponu eklenerek vortekslendi.
3. 11.000 g de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
4. Çökelti üzerine 250 µL 1X TE tamponu eklenerek, 95 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
5. 11.000 g de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant kısım DNA ekstraktı olarak -20 °C’de saklandı.

5.3.2 Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin hsp65 gen bölgelerinin PZT ile çoğaltılması

Tüberküloz dışı mikobakterilerin DNA’larından, hsp65 gen bölgeleri PZT ile çoğaltıldı.

Gereçler:

1. TDM DNA
2. 25 mM MgCl₂
3. dH₂O
4. 10 mM dNTP
5. 10X buffer
6. Hot start taq DNA polimeraz
7. Primer 1 (Tb 11): 5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3'
8. Primer 2 (Tb 12): 5' CTTGTCTGAACCGCATACCCT 3'

Yöntem:

1. PZT karışımı (amplifikasyon miksi) aşağıda belirtilen miktarlarda her örnek için hazırlandı.

dH ₂ O	35,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3,0 µl
dNTP 10 mM	1,0 µl
10 X Buffer	5,0 µl
Primer 1 (Tb11)	1,0 µl
Primer 2 (Tb12)	1,0 µl
Hot start taq DNA polimeraz	0,5 µl
Toplam hacim	47,0 µl

2. Çalışılacak örnek sayısı kadar hazırlanan karışım 0.5mL’lik tüplerin her birine 47 µL dağıtıldı.

3. Üzerlerine 3µL ekstrakte DNA eklendi

4. *Thermal cycler* aletine (Techne TC-412) yerleştirildi. *Thermal cycler* aletinde aşağıdaki siklus programı uygulandı

95 °C de 5 dakika ön denatürasyon

94°C de 1 dakika|

60°C de 1 dakika| → 40 döngü

72°C de 1 dakika|

72 °C de 10 dakika son uzatma

5. Reaksiyon 4°C’de durduruldu. Amplifikasyon ürünü saptama basmağının uygulanacağı zamana kadar 2–8°C’de saklandı.

5.3.3 Agaroz Jel Elektroforezi:

Tüberküloz dışı mikobakterilerin DNA’larından PZT ile çoğaltılan hsp65 gen bölgeleri gösterildi.

Gereçler:

1. EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) stok solüsyonu (0,5M)

2. Tris-Borik asit-EDTA (TBE 10X)

Trizma base (Sigma T1503) 54 g

Borik asit (Sigma B6768) 27,5g

Na₂EDTA (0,5M) 20 mL

450 mL distile su içerisinde eritildi, soğuduktan sonra üzerine 20 ml Na₂EDTA eklendi ve 500 mL’ye tamamlandı.

TBE 1X’e indirgenerek kullanıldı.(1/10 sulandırılır)

3. Etidyum bromit solüsyonu (EtBr) (10 mg/mL)

Etidyum bromit (Sigma E8751) 1 g

Distile suyla 100 mL’ye tamamlandı.

Işıktan korumak için aliminyum folyo ile kaplandı, oda sıcaklığında saklandı.

4. Jel yükleme tamponu (Fermentas #R0629) -20 °C’de saklandı

5. 50 bp. DNA ladder -20 °C’de saklandı.

6. Agar

Yöntem:

1. %2’ lik agaroz jel (%2’ lik agaroz jel = 1.4 g agaroz, 70 mL 1 X TBE, 2.8 µL EtBr) elektroforez tankı kullanılarak döküldü.

2. Katılaşması için 20 dk beklendi.

3. İlk kuyucuğa standard belirleyici olarak 50 bp. DNA ladder yüklendi.
4. İkinci kuyucuktan itibaren 2 µL jel yükleme tamponu ile homojen olarak karıştırılan her primer için ayrı 10 µL PZT ürünü yüklendi.
5. Son kuyucuğa standart belirleyici olarak 50 bp. DNA ladder yüklendi.
6. 45 dk. 120 voltta elektroforez yapıldı.
7. UV transluminatör üzerinde jel fotoğraflandı.

5.3.4 Gösterilen DNA ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi

Gereçler:

1. PZT Ürünü
2. dH₂O
3. 5X Buffer
4. *Bst*E II
5. *Hae* III

Yöntem:

1. *Bst*E II ve *Hae* III enzimleriyle kesimde aşağıda belirtilen miktarlar her örnek için hazırlandı.

<i>Bst</i> E II	0,5 µl
<i>Hae</i> III	0,5 µl
5X buffer	2,5 µl
dH ₂ O	12,0 µl
2. *Bst*E II ve *Hae* III için hazırlanan karışım 0.5mL'lik tüplerin her birine, 15 µL olarak dağıtıldı.
3. PZT ürünü 10 µl eklendi.
4. *Bst*E II içeren karışım 60°C de, *Hae* III içeren karışım 37°C 1 saat tutuldu.

5.3.5 Metafor agar jel elektroforezi:

Gereçler:

1. EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) stok solüsyonu (0,5M)
2. Tris-Borik asit-EDTA (TBE 10X)
3. Etidyum bromit solüsyonu (EtBr) (10 mg/mL)
4. Jel yükleme tamponu (Fermentas #R0629) -20 °C'de saklandı
5. 50 bp. DNA ladder -20 °C'de saklandı.
6. Metafor Agar

Yöntem:

1. %4' lik metafor jel (%4' lik metafor jel = 3 g agaroz, 75 mL 1 X TBE, 3 µL EtBr) elektroforez tankı kullanılarak döküldü.
2. Katılaşması için 30 dk beklendi.
3. İlk kuyucuğa standart belirleyici olarak 50 bp. DNA ladder yüklendi.
4. İkinci kuyucuktan itibaren 2 µL jel yükleme tamponu ile homojen olarak karıştırılan 10 µL Restriksiyon ürünü yüklendi.
5. Son kuyucuğa standart belirleyici olarak 50 bp. DNA ladder yüklendi.
6. 60 dk. 120 voltta elektroforez yapıldı.
7. UV transluminatör üzerinde jel fotoğraflandı.

5.3.6 Restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu oluşan paternler aşağıdaki tanımlama cetvellerine göre tanımlandı [61].

BstEII			HaeIII	species	type	phenotypic	strain or reference
440	195	90	60	<i>confluentis</i>	1	RGN	CIP 105510
	180	145		<i>gilvum</i>	1	RGS	DSM 44503
	175	90	60	<i>gadium</i>	1	RGS	CIP 105388
	175	90		<i>tusciae</i>	1	SGS	CIP 106367
	170	130		<i>triviale</i>	1	SGN	ATCC 23292 DSM 44153
	160	90	60	<i>vaccae</i>	1	RGS	ATCC 15483 CIP 105934
	160	85	55	<i>flavescens</i>	3	RGS	PRAsite
	145	130		<i>florentinum</i>	1	SGN	DSM 44852
	145	130		<i>lentiflavum</i>	1	SGS	CIP 105465
	145	130		<i>simiae</i>	5	SGP	PRAsite
	145	90	60	50 <i>komossense</i>	1	RGS	CIP 105293
	145	90	60	<i>parafortuitum</i>	1	RGN	CIP 106802
	145	70	60	55 <i>brumae</i>	1	RGS	CIP 103465
	140	100	60	50 <i>holsaticum</i>	1	RGS/RGN	DSM44478
	140	60	50	<i>novocastrense</i>	1	RGP	CIP 105546
	140	55	50	<i>flavescens</i>	1	RGS	CIP 104533
	135	130	65	<i>duvalii</i>	1	RGS	CIP 104539
	130	115	70	60 <i>aurum</i>	2	RGS	ATCC 23366 CIP104465
	130	105	70	<i>szulgai</i>	1	SGS	CIP 104532 ATCC 35799
	125	105	60	<i>nebraskense</i>	1	SGS	DSM 44803
320 130	265	130		<i>leprae</i>	1	-	[16]
	200	70	60	55 <i>immunogenum</i>	2	RGN	[4]
	200	60	55	50 <i>chelonae</i>	1	RGN	ATCC 35749 CIP 104535
	160	110		<i>haemophilum</i>	1	SGN	ATCC 35752 ATCC 19237
	145	70	60	55 <i>immunogenum</i>	1	RGN	ATCC 29548 CIP 105049
	140	130	50	<i>elephantis</i>	1	RGS	ATCC 700506 CIP 106684
	140	95	80	<i>cosmeticum</i>	1	RGS	CIP 106831
	140	90	80	<i>canariense</i>	1	RGN	ATCC BAA-879
	140	65	60	<i>mucogenicum</i>	1	RGN	CIP 107998
	130	115	60	50 <i>botniense</i>	1	RGN	ATCC 49650 ATCC 49651
	125	95	80	<i>lacus</i>	1	SGS	DSM 44537
					1	SGN	DSM44577
320 115	245	140		<i>fluoranthenvivorans</i>	1	RGN	DSM 44556
	195	70	60	50 <i>aichiense</i>	1	RGS	ATCC 27280 DSM 44147
	185	145		<i>fallax</i>	1	RGN	CIP 81.39
	185	140		<i>terrae</i>	2	SGN	[44]
	180	160	55	<i>frederiksbergense</i>	1	RGS	DSM 44346
	180	130		<i>terrae</i>	1	SGN	ATCC 15755 CIP 104321
	175	90	60	<i>sphagni</i>	1	RGN	DSM 44076
	170	140		<i>neocaurum</i>	1	RGS	CIP 105387
	170	140		<i>parafortuitum</i>	2	RGN	ATCC 19686
	160	125	60	<i>rhodesiae</i>	1	RGS	CIP 106806
	145	140	60	<i>diemhoferi</i>	1	RGN	CIP 105384
	145	130	60	<i>montefiorensense</i>	1	SGN	ATCC BAA-256 ATCC 700071
	145	130		<i>lentiflavum</i>	2	SGS	DSM 44602
	145	130		<i>simiae</i>	4	SGP	[15]
	145	130	50	<i>triplex</i>	1	SGN	PRAsite
	145	80	60	<i>aubagnense</i>	1	SGN	CIP 106108
	145	75	60	<i>arupense</i>	1	RGN	CIP 108543
	145	65	60	<i>mucogenicum</i>	1	SGN	CST0506 CST7052
	145	65	60	<i>phocaicum</i>	2	RGN	CIP 105223 ATCC 49649
	145			<i>cookii</i>	1	RGN	CIP 108542
	145			<i>cooki</i>	1	SGS	CIP 105396
	140	135	50	<i>pulveris</i>	1	RGN	CIP 105396
	140	90	60	<i>chitae</i>	1	RGN	CIP 106804
	140	90	60	<i>mucogenicum</i>	1	RGN	ATCC 19627 CIP 105383
	140	90	60	<i>nonchromogenicum</i>	3	RGN	clinical isolate
	140	90	60	<i>nonchromogenicum</i>	2	SGN	clinical isolate
	140	60	50	<i>terrae</i>	3	SGN	[44]
	130	115	60	<i>gordonae</i>	4	SGS	isolate 87-613
	130	110	70	60 <i>gordonae</i>	8	SGS	[12]
	130	110	70	<i>kumamotoense</i>	1	SGN	CST7247
	130	95	75	60 <i>kansasii</i>	5	SGP	[28]
	125	105		<i>genavense</i>	1	SGN	DSM 44424

Tablo 5. Mikobakteri tür tanımlama cetveli (1)

BstEII			HaeIII	species	type	phenotypic	strain or reference
	225	110		<i>shottsii</i>	1	SGN	ATCC 700981 NCTC 13215
	200	90	60	<i>moriokaense</i>	1	RGN	CIP 105393
	200	70	60	<i>abscessus</i>	2	RGN	ATCC 14472
	200	70	60	<i>bolletii</i>	1	RGN	CIP 108541
	200	70	60	<i>massiliense</i>	1	RGN	CCUG 48898
	190	105	80	<i>ulcerans</i>	2	SGN/SGS	[21]
	185	130		<i>genavense</i>	2	SGN	ATCC 51233
	185	130		<i>simiae</i>	1	SGP	ATCC 25275
	180	135	70	<i>thermorresistibile</i>	1	RGS	CIP 105390 ATCC 19527
	180	100	50	<i>hassiacum</i>	1	RGS	ATCC 700660 CIP 105218
	160	95	50	<i>poriferae</i>	1	RGS	CIP 105394
	160	60	50	<i>austroafricanum</i>	1	RGS	CIP 105395
	160	60	50	<i>vanbaalenii</i>	1	RGS	DSM 7251
	155	140		<i>simiae</i>	2	SGP	[14]
	145	140	100	<i>peregrinum</i>	1	RGN	CIP 105382 ATCC 14467
	145	140	75	<i>parascrofulaceum</i>	5	SGS	[38]
	145	130	95	<i>scrofulaceum</i>	1	SGS	CIP 105416 ATCC 19981
	145	130	60	<i>parmense</i>	1	SGS	CIP 105394
	145	130		<i>avium s. avium</i>	3	SGN	[20]
	145	130		<i>interjectum</i>	1	SGS	DSM 44064 ATCC 51457
	145	130		<i>intermedium</i>	1	SGP	ATCC 51848 CIP 104542
	145	130		<i>intracellulare</i>	3	SGN	PRASite
	145	130		<i>saskatchewanense</i>	1	SGS	CIP 108114
	145	130		<i>seoulense</i>	1	SGS	[36]
	145	130		<i>simiae</i>	6	SGP	[44]
	145	110	80	<i>pseudoshottsii</i>	1	SGP	ATCC BAA-883 NCTC 13318
	145	105	80	<i>malmoense</i>	2	SGN	PRASite
	145	105	80	<i>marinum</i>	1	SGP	ATCC 927 CIP 104528
235	145	105	80	<i>ulcerans</i>	1	SGN/SGS	CIP 105425 ATCC 19423
210	145	105		<i>bohemicum</i>	1	SGS	CIP 105811
	145	70	60	<i>abscessus</i>	1	RGN	CIP104536 ATCC19977
	140	125	100	<i>peregrinum</i>	2	RGN	isolate B1285
	140	125	100	<i>porcinum</i>	1	RGN	ATCC 49939 DSM 44242
	140	125	100	<i>septicum</i>	1	RGN	ATCC BAA-328 ATCC 33776
	140	125	60	<i>boenicki</i>	1	RGN	ATCC 700731 CIP 106642
	140	125	60	<i>senegalense</i>	3	RGS	CIP 107829
	140	115	70	<i>terrae</i>	4	SGN	ATCC 35796
	140	105	80	<i>intracellulare</i>	2	SGN	this work
	140	100	60	<i>kubicae</i>	1	SGS	PRASite
	140	90	60	<i>chlorophenolicum</i>	1	RGS	ATCC 700732 CIP 106428
	140	90	60	<i>chubuense</i>	1	RGS	CIP 104189
	140	90	60	<i>conspicuum</i>	1	RGS	CIP 106810
	140	90	60	<i>obuense</i>	1	RGS	CIP 105165
	140	80	60	<i>phlei</i>	1	RGS	CIP 106803
	130	115		<i>gordonae</i>	1	RGS	ATCC 11758 CIP 105389
	130	115		<i>heidelbergense</i>	5	SGS	strain 79/02
	130	115		<i>interjectum</i>	1	SGN	CIP 105424
	130	105	80	<i>branderi</i>	2	SGS	[44]
	130	105	80	<i>kansasii</i>	1	SGN	CIP 104592
	130	105	60	<i>avium s. avium</i>	1	SGP	ATCC 12478 CIP 104589
	130	105	60	<i>colombiense</i>	2	SGN	[20]
	130	105	60	<i>avium s. avium</i>	1	SGN	CIP 108962
	130	105		<i>avium s. paratuberculosis</i>	1	SGN	ATCC 25291
	130	105		<i>avium s. silvaticum</i>	1	SGN	CIP 103963 K10
	130	95	80	<i>parascrofulaceum</i>	1	SGN	CIP 103317
	130	95		<i>palustre</i>	3	SGS	[38]
	130	80	60	<i>celatum</i>	1	SGS	DSM 44572
	120	115	110	<i>intracellulare</i>	1	SGN/SGS	ATCC 51131 CIP 106109
	115	105		<i>asiaticum</i>	4	SGN	PRASite
					1	SGP	ATCC 25276 DSM 44297

Tablo 5. Mikobakteri tür tanımlama cetveli (2)

BstEII	HaeIII	species	type	phenotypic	strain or reference
		<i>doricum</i>	1	SGS	DSM 44339
		<i>aurum</i>	1	RGS	[14]
		<i>agri</i>	1	RGN	CIP105391
		<i>monacense</i>	1	SGS	[37]
		<i>peregrinum</i>	3	RGN	isolate FI-05382
		<i>simiae</i>	3	SGP	[22]
		<i>goodii</i>	1	RGN	CIP 106349 ATCC 700504
		<i>mageritense</i>	1	RGN	CIP 104973
		<i>smegmatis</i>	1	RGN	ATCC 35796 ATCC 19420
		<i>alvei</i>	1	RGN	CIP 104444
235 130 85		<i>murale</i>	1	RGN	CIP 103464
		<i>senegalense</i>	2	RGS	CIP 105980
		<i>wolinski</i>	1	RGN	[39]
		<i>gordonae</i>	6	SGS	ATCC 700010 CIP 106348
		<i>shimodei</i>	1	SGN	[14]
		<i>hodleri</i>	1	RGS	DSM 44152 ATCC 27962
		<i>tokaiense</i>	1	RGS	CIP 104909
		<i>celatum</i>	2	SGN/SGS	CIP 106807
		<i>gastris</i>	1	SGN	ATCC 51130
		<i>kansasii</i>	6	SGP	CIP 104530 ATCC 15754
		<i>kansasii</i>	2	SGP	[44]
		<i>kansasii</i>	3	SGP	PRAsite
		<i>parascrofulaceum</i>	4	SGS	PRAsite
		<i>gordonae</i>	9	SGS	[38]
		<i>heckeshornense</i>	1	SGS	strain 49/21/03
		<i>gordonae</i>	7	SGS	DSM 44428
235 120 100		<i>chimaera</i>	1	SGN	PRAsite
		<i>intracellulare</i>	1	SGN	CIP 107892
		<i>lentiflavum</i>	3	SGS	ATCC 13950 CIP 104243
		<i>malmoense</i>	1	SGN	strain 21210
		<i>brisbanense</i>	1	RGN	ATCC 29571 CIP 105775
		<i>hibemiae</i>	1	SGS	CIP 107830
		<i>gordonae</i>	3	SGS	DSM44241
		<i>gordonae</i>	10	SGS	[12]
		<i>gordonae</i>	2	SGS	this work
		<i>senegalense</i>	4	RGS	[12]
		<i>gordonae</i>	1	SGS	ATCC 35796
		<i>xenopi</i>	1	SGN	CIP 104529 ATCC 14470
		<i>tuberculosis complex</i>	1	SGN	ATCC 19250 CIP 104035
		<i>shermisii</i>	1	SGN	ATCC 27294
		<i>fortuitum</i>	1	RGN	ATCC BAA-832
		<i>fortuitum s. acetamidolyticum</i>	1	RGN	ATCC 6841 CIP 104534
		<i>nonchromogenicum</i>	1	RGN	CIP 105423
235 120 85		<i>conceptionense</i>	1	SGN	ATCC 19530
		<i>fardinogenes</i>	1	RGN	CIP 108544
		<i>houstonense</i>	1	RGN	ATCC 35753
		<i>neworleanense</i>	1	RGN	ATCC 49403 DSM 44676
		<i>senegalense</i>	1	RGS	ATCC 49404
		<i>fortuitum</i>	2	RGN	CIP 104941 ATCC BAA-850
		<i>parascrofulaceum</i>	1	SGS	ATCC 35755 ATCC BAA-849
		<i>fortuitum</i>	3	RGN	ATCC 49404 ATCC 49403
		<i>kansasii</i>	4	SGS	[38]
		<i>lentiflavum</i>	4	SGS	[35]
		<i>parascrofulaceum</i>	2	SGS	[28]
					[15]
					CIP 108112 strain BAA-614

Tablo 5. Mikobakteri tür tanımlama cetveli (3)

6. BULGULAR

6.1 İzolatlar

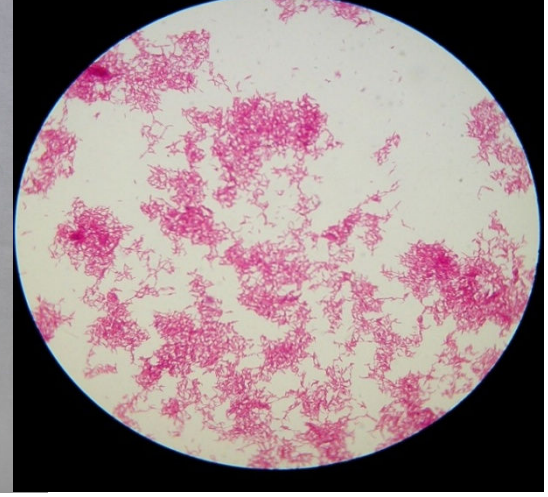
2004-2010 yılları arasında DEÜ Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Mikobakteriyoloji Laboratuvarına gelen 156 adet solunum yolu örneği çalışmaya alındı. Solunum yolu örneklerinin 67 tanesi (%42.9) kadın, 89 tanesi (%57.1) erkek hastaya aitti. Örneklerin dağılımı; 66 (%42.3) balgam, 77 (%49.4) BL, 11 (%7.0) bronkoalveolar lavaj (BAL) ve 2 (%1.3) trakeal sekret şeklindeydi.

Laboratuvarımızda *M. tuberculosis* kompleks ve TDM olarak tanımlanan klinik örneklerden soyutlanan izolatların yıllara göre dağılımı tablo 6’da görülmektedir.

Tablo 6. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) ve TDM’lerin yıllara göre dağılımı.

Tarih		MTK Sayısı	TDM Sayısı	Çalışmaya Alınan TDM Sayısı	Laboratuara Gelen Örnek Sayısı
2004	Solunum Yolu Örnekleri	46	31	20	1789
	Solunum yolu dışı Örnekler	19	6	0	
2005	Solunum Yolu Örnekleri	80	10	4	2239
	Solunum yolu dışı Örnekler	16	2	0	
2006	Solunum Yolu Örnekleri	94	15	15	2230
	Solunum yolu dışı Örnekler	17	1	0	
2007	Solunum Yolu Örnekleri	99	38	35	2630
	Solunum yolu dışı Örnekler	23	8	0	
2008	Solunum Yolu Örnekleri	55	50	48	2514
	Solunum yolu dışı Örnekler	11	4	0	
2009	Solunum Yolu Örnekleri	83	15	12	2750
	Solunum yolu dışı Örnekler	37	6	0	
2010	Solunum Yolu Örnekleri	64	26	22	2648
	Solunum yolu dışı Örnekler	29	0	0	

2004-2009 yılları arasında TDM üreyen hasta örnekleri, LJ besiyerlerine pasajlandı. Haftada bir kez olmak üzere üremeleri kontrol edilerek, üreme zamanları not edildi. 2010 yılı örnekleri doğrudan çalışmaya alındı. Üreme olan LJ besiyerlerindeki kolonilerin aside dirençli oldukları Kinyoun boyama ile doğrulandı (Resim 4 ve 5).



Resim 4. Üreme olan L-J örnekleri

Resim 5. Üreyen koloni Kinyoun preparatı

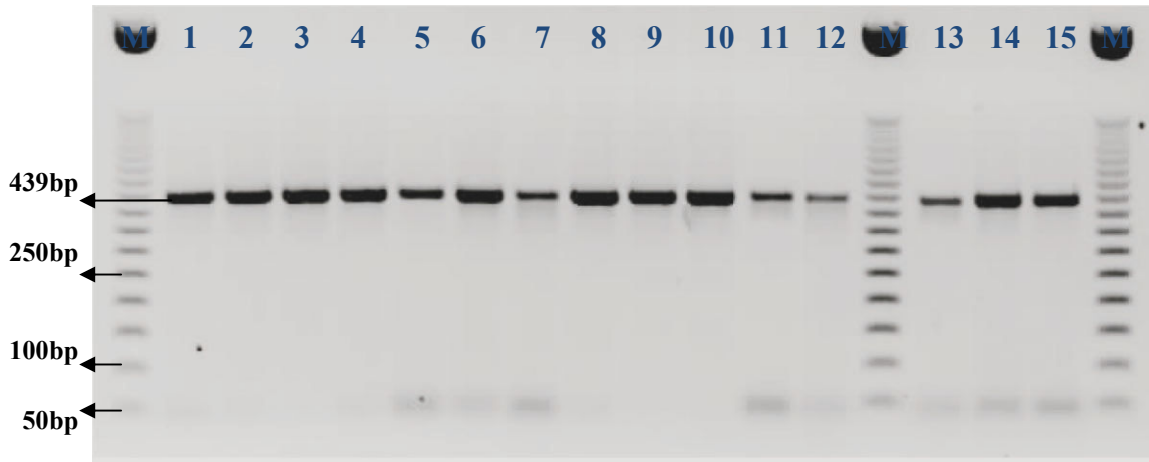
Hasta örnekleri dışında kalite kontrol (KK) suşlarından; *M. intracellulare* tip 1 (ATCC 13950), *M. abscessus* tip 1 (ATCC 19977), *M. fortuitum* tip 1 (ATCC 6841), *M. gordonae* tip 1 (ATCC 14470), *M. scrofulaceum* tip 1 (ATCC 19981), *M. szulgai* (ATCC 35799), *M. kansasii* tip 1 (ATCC 12478) ve H37Rv çalışmaya alındı (Tablo 7).

Tablo 7. Çalışmadaki kalite kontrol suşları.

Kalite Kontrol Suşu	Çalışma No.
<i>Mycobacterium intracellulare</i> tip 1 (ATCC 13950)	KK ₁
<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1 (ATCC 19977)	KK ₂
<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 (ATCC 6841)	KK ₃
<i>Mycobacterium gordonae</i> tip 1 (ATCC 14470)	KK ₄
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> tip 1 (ATCC 19981)	KK ₅
<i>Mycobacterium szulgai</i> (ATCC 35799)	KK ₆
<i>Mycobacterium kansasii</i> tip 1 (ATCC 12478)	KK ₇
H37Rv	KK ₈

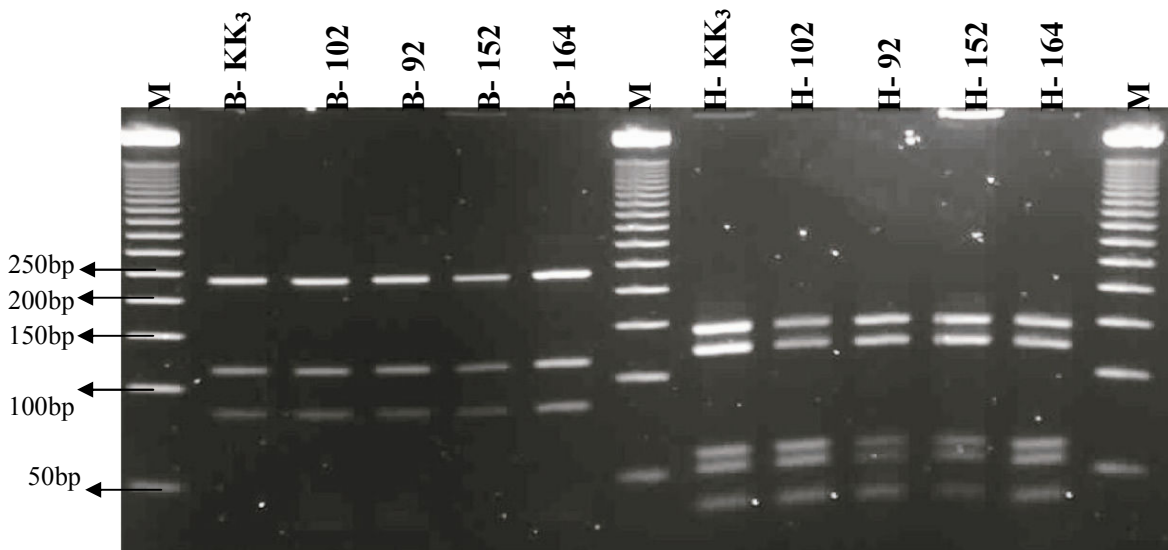
6.2 PZT-restriksiyon enzim analizi yöntemi (PRA) Sonuçlar

Löwenstein-Jensen ve/veya BACTEC 12B ve/veya MGIT besiyerlerinde üreyen TDM izolatlarından elde edilen DNA'larla gereç ve yöntemde belirtilen protokollerle gerçekleştirilen PZT ile hedeflenen 439 baz çiftlik ürün elde edildi (Resim 6). Ürün, *Hae* III ve *Bst*E II restriksiyon enzimleriyle kesilerek metafor agarda elektroforez gerçekleştirildi (Resim 7, 8, 9, 10, 11). Tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlamaları, *Hae* III ve *Bst*E II restriksiyon enzimleriyle elde edilen kesim paternlerine göre tür tanımlama cetveline ve <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> internet adresinden yararlanarak yapıldı.



Resim 6: TDM'lerden elde edilen PZT bant görünümüleri;

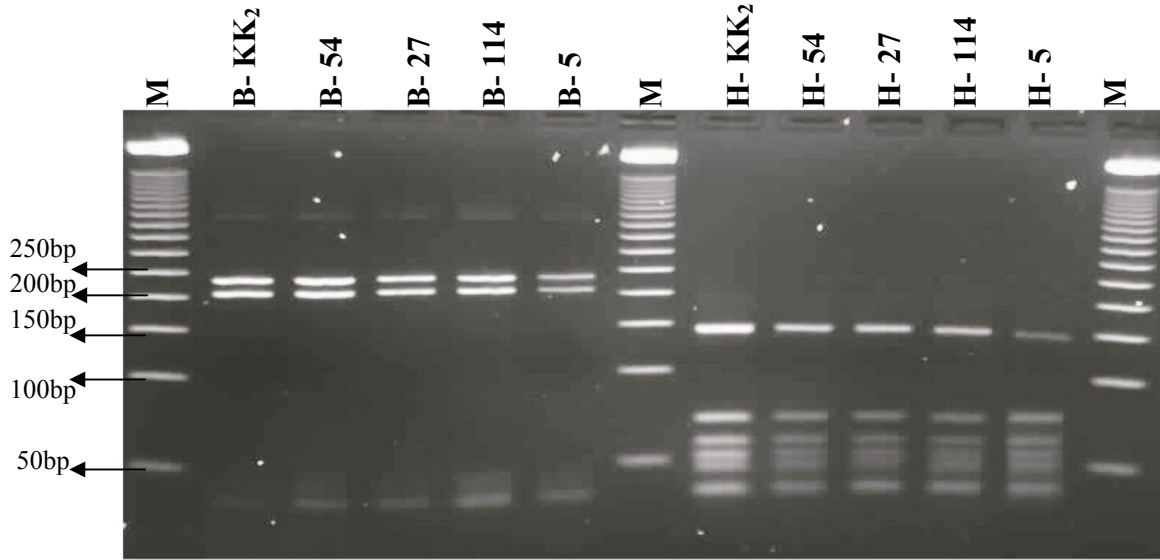
M: Marker (50bp.), **1-15.** kuyular, sırasıyla; 29, 28, 30, 43 58, 90, 13, 60, 88, 118, 176, 5, 27, 54, 135 numaralı çalışma örnekleri (beklenen bant büyüklüğü: 439 bp.).



Resim 7. PZT-restriksiyon enzim analizi kesim paternleri

M: Marker (50bp.), **B:** *BstE* II enzim kesim ürünlerinin bant paternleri, **H:** *Hae* III enzim kesim ürünlerinin bant paternleri.

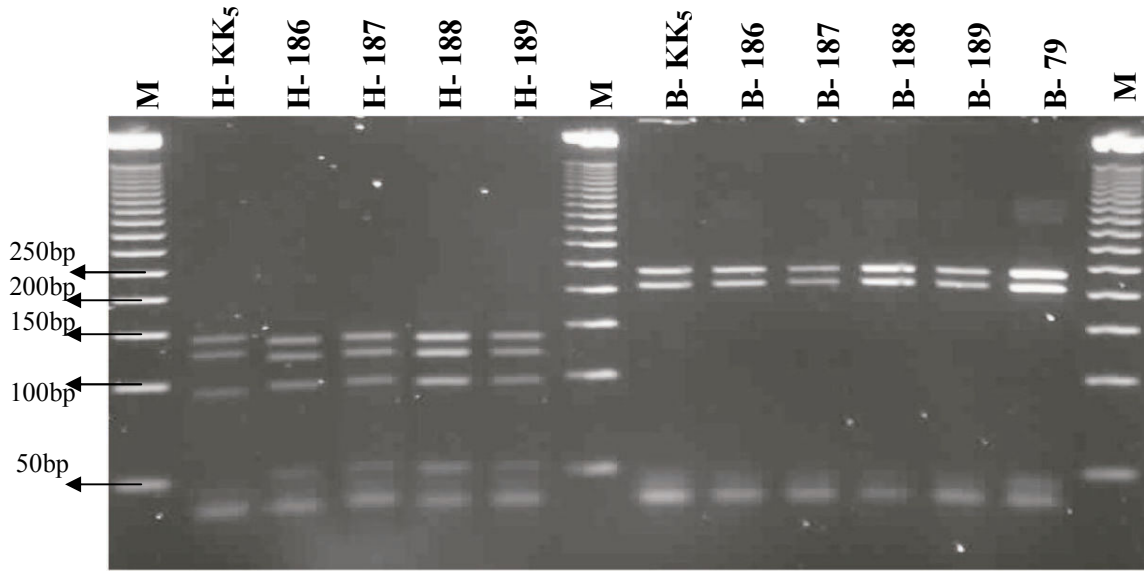
KK₃ {*Mycobacterium fortuitum* tip 1 (ATCC 6841)} kesim paternleri, *BstE* II enzimi için 235-120-85 bp. , *Hae* III enzimi için 145-120-60-55 bp. olarak bulundu. 102, 92, 152 ve 164 numaralı klinik izolatlar da *M. fortuitum* tip 1 olarak tanımlandı.



Resim 8. PZT-restriksiyon enzim analizi kesim paternleri

M: Marker (50bp.), **B:** *BstE* II enzim kesim ürünlerinin bant paternleri, **H:** *Hae* III enzim kesim ürünlerinin bant paternleri.

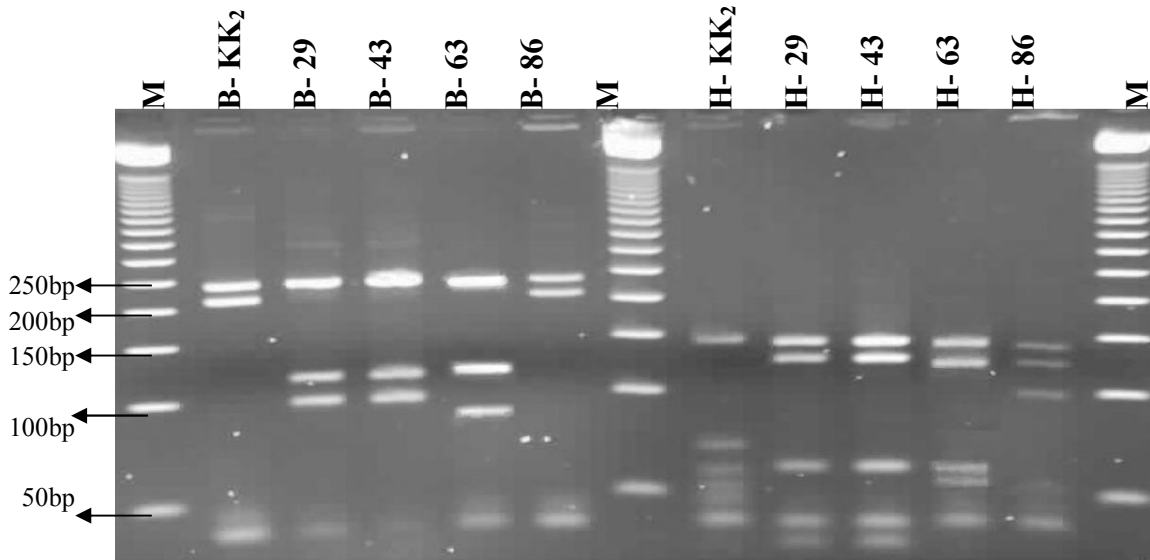
KK₂ {*Mycobacterium abscessus* tip 1 (ATCC 19977)} kesim paternleri, *BstE* II enzimi için 235-210 bp. , *Hae* III enzimi için 145-70-60 bp. olarak bulundu. 54, 27, 114 ve 5 numaralı klinik izolatların da *M. abscessus* tip 1 olduğu görüldü.



Resim 9. PZT-restriksiyon enzim analizi kesim paternleri

M: Marker (50bp.), **H:** *Hae* III enzim kesim ürünlerinin bant paternleri, **B:** *BstE* II enzim kesim ürünlerinin bant paternleri.

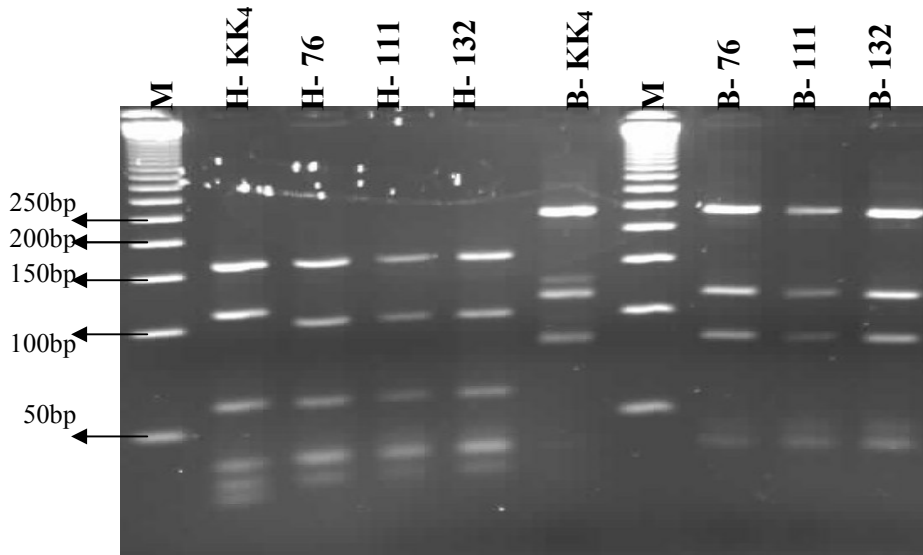
KK₅{*Mycobacterium scrofulaceum* tip 1 (ATCC 19981)} kesim paternleri, *BstE* II enzimi için 235-210 bp. , *Hae* III enzimi için 145-130-95 bp. olarak bulundu. 186, 187, 188 ve 189 numaralı klinik izolatların, kesim paternleri, *BstE* II enzimi için 235-210 bp. , *Hae* III enzimi için 140-125-100 bp. olduğu ve bu paternlerin; *M. porcinum* tip 1, *M. septicum* tip 1, *M. peregrinum* tip 2 türlerine ait olduğu değerlendirildi. 79 numaralı klinik izolatın *BstE* II enzimi ile kesim paterni, 235-210 bp. olarak bulundu.



Resim 10. PZT-restriksiyon enzim analizi kesim paternleri

M: Marker (50bp.), **B:** *BstE* II enzim kesim ürünlerinin bant paternleri, **H:** *Hae* III enzim kesim ürünlerinin bant paternleri.

KK₂ {*Mycobacterium abscessus* tip 1 (ATCC 19977)} kesim paternleri, *BstE* II enzimi için 235-210 bp. , *Hae* III enzimi için 145-70-60 bp. olarak bulundu. 29 ve 43 numaralı klinik izolatların, kesim paternleri, *BstE* II enzimi için 235-120-100 bp. , *Hae* III enzimi için 145-130-60 bp. olarak değerlendirildi ve bu paternlerin; *M. intracellulare* tip 1'e ait olduğu belirlendi. 63 ve 86 numaralı klinik izolatın sırasıyla kesim paternleri, *BstE* II enzimi için 235-120-85 ve 235-210 bp. *Hae* III enzimi için 145-120-60-55 ve 140-125-100 bp. olarak bulundu. 63 numaralı klinik izolatın *M. fortuitum* tip 1, 86 numaralı klinik izolatın *M. porcinum* tip 1, *M. septicum* tip 1, *M. peregrinum* tip 2 türlerine ait olduğu saptandı.



Resim 11. PZT-restriksiyon enzim analizi kesim paternleri

M: Marker (50bp.), **H:** *Hae* III enzim kesim ürünlerinin bant paternleri, **B:** *BstE* II enzim kesim ürünlerinin bant paternleri.

KK₄ {*Mycobacterium gordonae* tip 1(ATCC 14470)} kesim paternleri, *BstE* II enzimi için 235-120-85 bp., *Hae* III enzimi için 160-115-60 bp. olarak bulundu. 76, 111 ve 132 numaralı klinik izolatların kesim paternleri, *BstE* II enzimi için 235-120-85 bp. , *Hae* III enzimi için 160-105-60 bp. olduğu ve bu paternlerin *M. xenopi* tip1'e ait olduğu saptandı.

Çalışmamızda kullanılan TDM türlerinin kesim paternleri ve sonuçları tablo 8'de görülmektedir.

Tablo 8. PZT-restriksiyon enzim analizi paternleri ve sonuçlar.

Yıl	Çalışma No	Örnek	BstE II	Hae III	Sonuç
2004	159	BL	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum</i> tip 1
2004	92	BALGAM	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum</i> tip 1
2004	147	BALGAM	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum</i> tip 1
2004	93	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2004	94	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2004	95	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2004	96	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2004	97	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2004	98	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2004	88	BL	440-0-0	145-130-0	<i>Mycobacterium simiae</i> tip 5 <i>Mycobacterium lentiflavum</i> tip 1 <i>Mycobacterium florentinum</i> tip 1
2004	168	BALGAM	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum</i> tip 1
2004	90	BALGAM	235-210	130-105-60	<i>Mycobacterium colombiense</i> tip 1 <i>Mycobacterium avium s. avium</i> tip 2
2004	158	BALGAM	440-0-0	ø	Ø
2004	155	BALGAM	440-0-0	ø	Ø
2004	156	BALGAM	440-0-0	ø	Ø
2004	118	BL	440-0-0	145-130-0	<i>Mycobacterium simiae</i> tip 5 <i>Mycobacterium lentiflavum</i> tip 1 <i>Mycobacterium florentinum</i> tip 1
2004	119	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2004	153	BL	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum</i> tip 1
2004	120	BL	235-120-100	ø	Ø
2004	154	BL	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum</i> tip 1
2005	122	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2005	123	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2005	152	BALGAM	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum</i> tip 1
2005	121	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	151	BALGAM	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2006	134	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	133	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	124	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	162	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	129	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	126	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	125	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	135	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	127	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	161	BALGAM	440-0-0	ø	Ø
2006	160	BL	440-0-0	ø	Ø
2006	131	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2006	130	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1

Tablo 8. PZT-restriksiyon enzim analizi paternleri ve sonuçlar (devamı 2)

2006	128	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	109	BALGAM	235-210	185-130-0	<i>Mycobacterium genavense</i> tip 2 <i>Mycobacterium simiae</i> tip 1
2007	34	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	164	BALGAM	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum s. Acetamidolyticum</i> tip 1
2007	43	BALGAM	235-120-100	145-130-60	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tip 1 <i>Mycobacterium chimaera</i> tip 1
2007	41	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	149	BALGAM	440-0-0	ø	Ø
2007	115	TS	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum s. Acetamidolyticum</i> tip 1
2007	44	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	107	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2007	33	BAL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	114	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	30	BALGAM	235-120-100	145-130-60	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tip 1 <i>Mycobacterium chimaera</i> tip 1
2007	108	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2007	29	BALGAM	235-120-100	145-130-60	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tip 1 <i>Mycobacterium chimaera</i> tip 1
2007	111	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2007	28	BL	235-120-100	145-130-60	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tip 1 <i>Mycobacterium chimaera</i> tip 1
2007	150	BALGAM	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum s. Acetamidolyticum</i> tip 1
2007	27	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	52	BALGAM	235-120-100	145-130-60	<i>Mycobacterium intracellulare</i> tip 1 <i>Mycobacterium chimaera</i> tip 1
2007	56	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2007	50	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	31	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	53	BAL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	110	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	165	BALGAM	440-0-0	ø	Ø
2007	112	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2007	49	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	42	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2007	32	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2007	54	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	40	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	116	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	117	BAL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2007	113	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2007	6	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	74	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	15	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	60	BL	440-0-0	145-130-0	<i>Mycobacterium simiae</i> tip 5 <i>Mycobacterium lentiflavum</i> tip 1 <i>Mycobacterium florentinum</i> tip 1
2008	13-14	BL	440-0-0	145-130-0	<i>Mycobacterium simiae</i> tip 5 <i>Mycobacterium lentiflavum</i> tip 1 <i>Mycobacterium florentinum</i> tip 1
2008	16-17	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1

Tablo 8. PZT-restriksiyon enzim analizi paternleri ve sonuçlar (devamı 3)

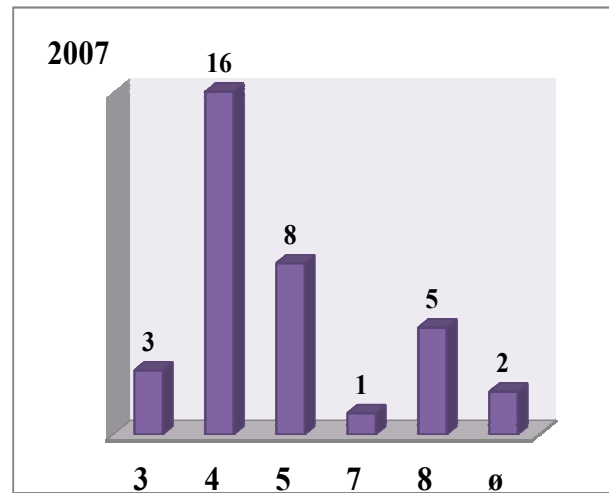
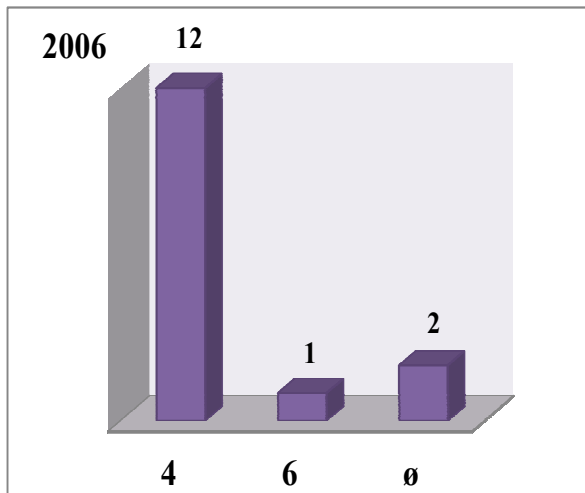
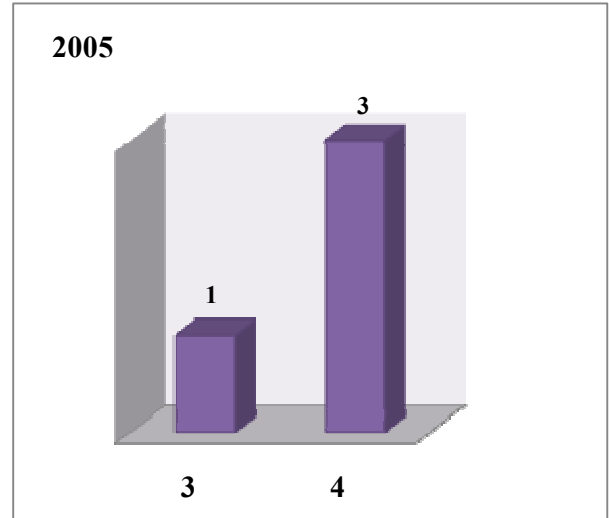
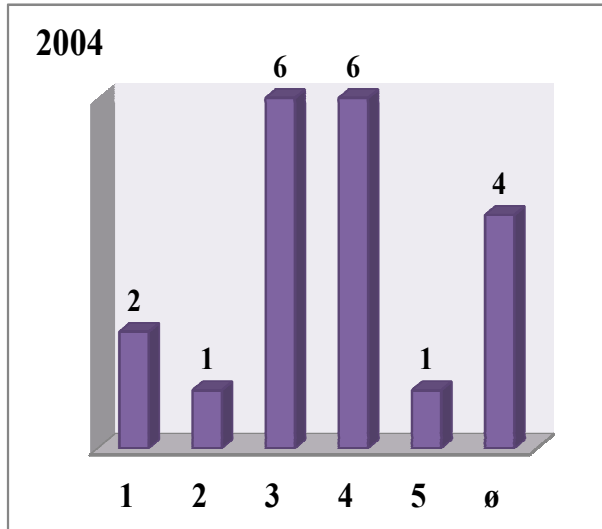
2008	69	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2008	46	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2008	59	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	25	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	23	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	144	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	58	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	70	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2008	26	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	47	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2008	61	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	20	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	19	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	18-169	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	62	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	57	BAL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	65	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	12	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2008	24	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	66	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	72-100	BAL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	73	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	55	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	145	BALGAM	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum</i> s. <i>acetamidolyticum</i> tip 1
2008	45-68-140	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	11	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	76	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2008	78	BL	440-0-0	140-60-50	<i>Mycobacterium novocastrense</i> tip 1
2008	67	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2008	71	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2008	79	BL SOL AC ALT	235-210	185-130-0	<i>Mycobacterium genavense</i> tip 2 <i>Mycobacterium simiae</i> tip 1
2008	82-83	BL SAĞ AC ALT	235-210	185-130-0	<i>Mycobacterium genavense</i> tip 2 <i>Mycobacterium simiae</i> tip 1
2008	80	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	84	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	77	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2008	64	BL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2008	102-139	BL	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum</i> s. <i>acetamidolyticum</i> tip 1
2008	138	BAL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2008	48-104	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2008	101	BALGAM	235-210	Ø	Ø
2008	141	BALGAM	235-130-85	140-120-95	<i>Mycobacterium gordonae</i> tip 6
2008	63	BL	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum</i> s. <i>acetamidolyticum</i> tip 1
2008	75-81	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2009	38	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1

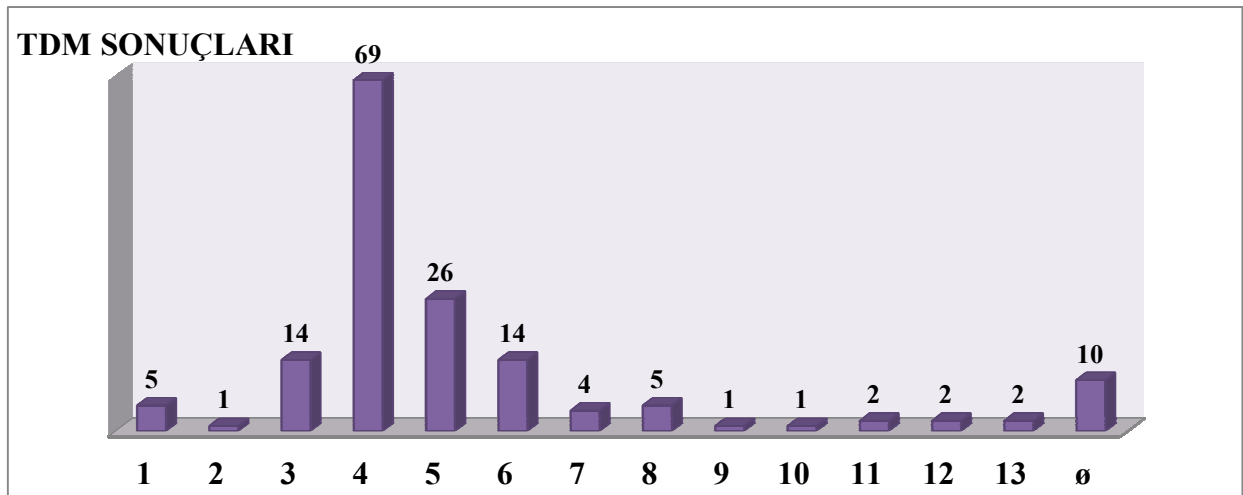
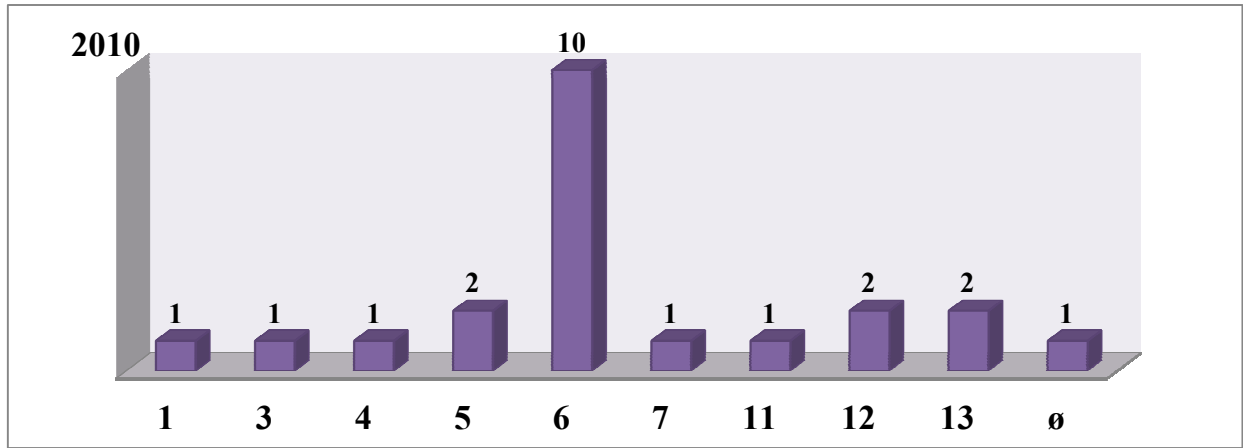
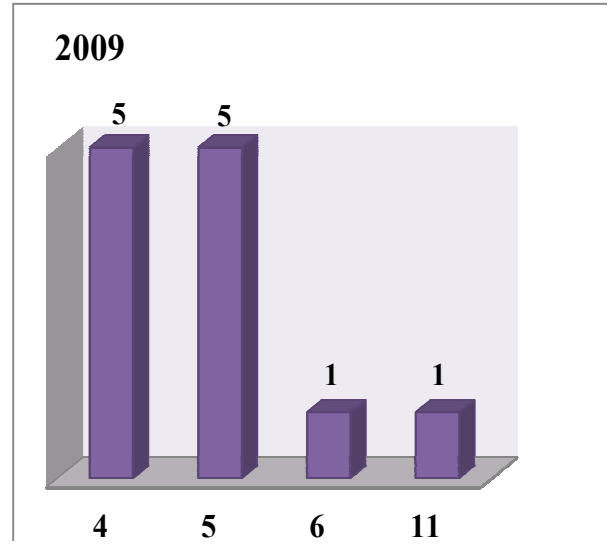
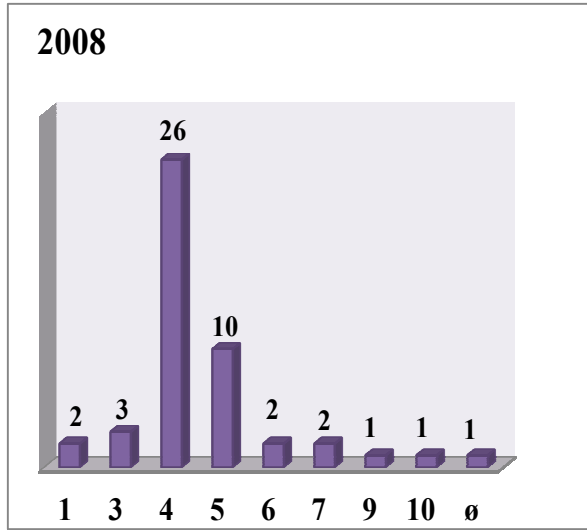
Tablo 8. PZT-restriksiyon enzim analizi paternleri ve sonuçlar (devamı 4)

2009	1	BL	235-210	130-105-0	<i>Mycobacterium avium</i> s. <i>avium</i> tip1 <i>Mycobacterium avium</i> s. <i>Paratuberculosis</i> tip 1 <i>Mycobacterium avium</i> s. <i>Silvaticum</i> tip 1
2009	7	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2009	148	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2009	91	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2009	35	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2009	4	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2009	36	BALGAM	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2009	167	BAL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2009	2	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2009	37	BL	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2009	5	TS	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2010	8	BALGAM	235-210	200-70-60	<i>Mycobacterium massiliense</i> tip 1 <i>Mycobacterium bolletii</i> tip 1 <i>Mycobacterium abscessus</i> tip2
2010	9	BAL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2010	10	BL	440-0-0	ø	Ø
2010	85-184	BALGAM	235-210	145-70-60	<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1
2010	86-174	BL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2010	171	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2010	172	BL	320-130	200-60-55	<i>Mycobacterium chelonae</i> tip 1
2010	175	BL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2010	176	BALGAM	440-0-0	145-130-0	<i>Mycobacterium simiae</i> tip 5 <i>Mycobacterium lentiflavum</i> tip 1 <i>Mycobacterium florentinum</i> tip 1
2010	177	BL	235-120-85	145-120-60	<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1 <i>Mycobacterium fortuitum</i> s. <i>Acetamidolyticum</i> tip 1
2010	178	BL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2010	179	BL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2010	180	BAL	320-130	200-60-55	<i>Mycobacterium chelonae</i> tip 1
2010	181	BALGAM	235-210	200-70-60	<i>Mycobacterium massiliense</i> tip 1 <i>Mycobacterium bolletii</i> tip 1 <i>Mycobacterium abscessus</i> tip2
2010	182	BL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2010	183	BL	235-120-85	160-105-60	<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1
2010	185-192	BL	235-210	130-105-0	<i>Mycobacterium avium</i> s. <i>avium</i> tip1 <i>Mycobacterium avium</i> s. <i>paratuberculosis</i> tip 1 <i>Mycobacterium avium</i> s. <i>silvaticum</i> tip 1

Tablo 8. PZT-restriksiyon enzim analizi paternleri ve sonuçlar (devamı 5)

2010	186	BL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2010	187	BL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2010	188	BAL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2010	189	BAL	235-210	140-125-100	<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1 <i>Mycobacterium septicum</i> tip 1 <i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2
2010	190	BL	235-210	185-130-0	<i>Mycobacterium genavense</i> tip 2 <i>Mycobacterium simiae</i> tip 1

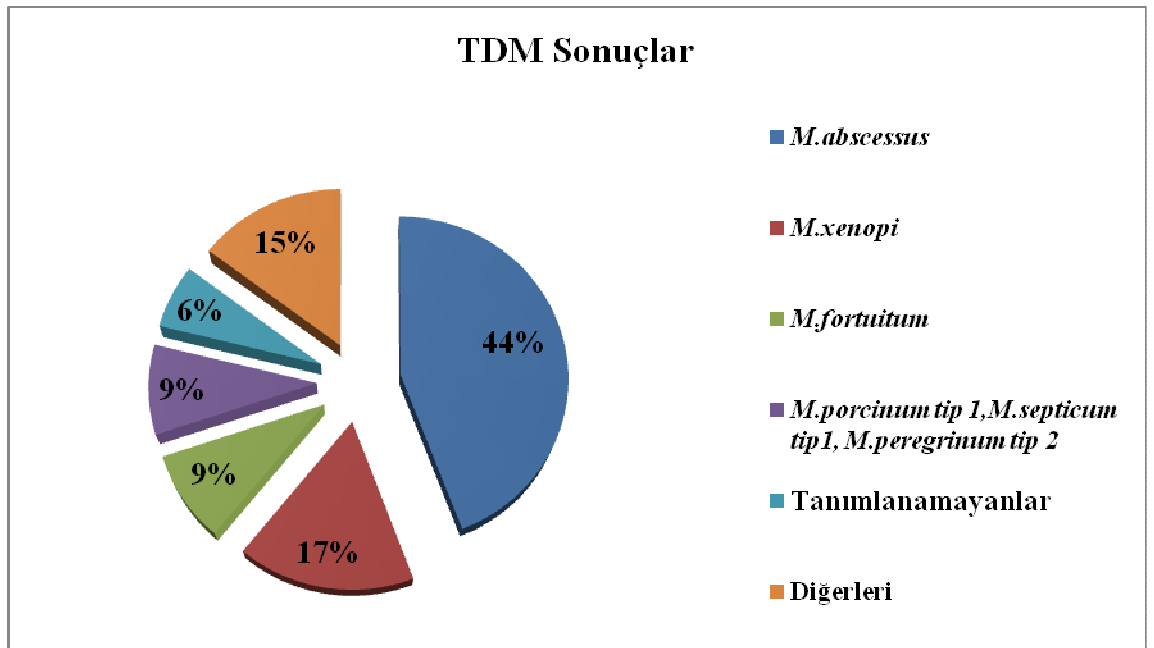




Şekil 1. TDM sonuçlarının yıllara göre dağılım grafikleri.

Grafiklerin altındaki rakamlar, aşağıdaki mikobakteri türlerini temsil etmektedir.

1. *Mycobacterium simiae* tip 5, *Mycobacterium lentiflavum* tip 1, *Mycobacterium florentinum* tip 1: 5 Adet
 2. *Mycobacterium colombiense* tip 1, *Mycobacterium avium s. avium* tip 2: 1 Adet
 3. *Mycobacterium fortuitum* tip 1, *Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum* tip 1: 14 Adet
 4. *Mycobacterium abscessus* tip 1: 69 Adet
 5. *Mycobacterium xenopi* tip 1: 26 Adet
 6. *Mycobacterium porcinum* tip 1, *Mycobacterium septicum* tip 1, *Mycobacterium peregrinum* tip 2: 14 Adet
 7. *Mycobacterium genavense* tip 2, *Mycobacterium simiae* tip 1: 4 Adet
 8. *Mycobacterium intracellulare* tip 1, *Mycobacterium chimaera* tip 1: 5 Adet
 9. *Mycobacterium gordonae* tip 6: 1 Adet
 10. *Mycobacterium novocastrense* tip 1: 1 Adet
 11. *Mycobacterium avium s. avium* tip1, *Mycobacterium avium s. paratuberculosis* tip 1, *Mycobacterium avium s. silvaticum* tip 1: 2 Adet
 12. *Mycobacterium massiliense* tip 1, *Mycobacterium bolletii* tip 1, *Mycobacterium abscessus* tip2: 2 Adet
 13. *Mycobacterium chelonae* tip 1: 2 Adet
- Ø- Tanımlanamayanlar



Şekil 2. TDM sonuçlarının dağılım grafiği

Tüberküloz dışı mikobakteri türlerinin örnek türüne göre dağılımı tablo 9’da görülmektedir.

Tablo 9. Tüberküloz Dışı Mikobakteri türlerinin örneklere göre dağılımı.

Tüberküloz Dışı Mikobakteriler	BL-BAL	Balgam	T.S	Toplam
<i>Mycobacterium abscessus</i> tip 1	42	26	1	69
<i>Mycobacterium xenopi</i> tip 1	11	15	-	26
<i>Mycobacterium porcinum</i> tip 1	13	1	-	14
<i>Mycobacterium septicum</i> tip 1				
<i>Mycobacterium peregrinum</i> tip 2				
<i>Mycobacterium fortuitum</i> tip 1	6	7	1	14
<i>Mycobacterium fortuitum s. acetamidolyticum</i> tip 1				
<i>Mycobacterium simiae</i> tip 5	4	1	-	5
<i>Mycobacterium lentiflavum</i> tip 1				
<i>Mycobacterium florentinum</i> tip 1				
<i>Mycobacterium intracellulare</i> tip 1	1	4	-	5
<i>Mycobacterium chimaera</i> tip 1				
<i>Mycobacterium genavense</i> tip 2	3	1	-	4
<i>Mycobacterium simiae</i> tip 1				
<i>Mycobacterium chelonae</i> tip 1	2	-	-	2
<i>Mycobacterium novocastrense</i> tip1	1	-	-	1
<i>Mycobacterium avium s. avium</i> tip1	2	-	-	2
<i>Mycobacterium avium s. paratuberculosis</i> tip1				
<i>Mycobacterium avium s. silvaticum</i> tip 1				
<i>Mycobacterium massiliense</i> tip 1	-	2	-	2
<i>Mycobacterium bolletii</i> tip 1				
<i>Mycobacterium abscessus</i> tip2				
<i>Mycobacterium gordonae</i> tip 6	-	1	-	1
<i>Mycobacterium colombiense</i> tip 1	-	1	-	1
<i>Mycobacterium avium s. avium</i> tip2				
Tanımlanamayan	3	7	-	10
Toplam	88	66	2	156

7. TARTIŞMA

Tüberküloz dışı mikobakteriler Robert Koch döneminden beri bilinmesine rağmen, tarihsel süreç boyunca TB'nin gölgesi altında kalmışlardır. Son yıllarda moleküler mikrobiyolojideki gelişmeler ile TDM'lerin insanlarda enfeksiyonlara neden olabilen gerçek patojenler oldukları anlaşılmıştır. Tüberküloz dışı mikobakteriler çevrede her yerde, sıklıkla toprakta, hem doğal hem de işlenmiş su kaynaklarında, hayvanlarda ve süt ürünlerinde serbest olarak yaşayabilirler. Ayrıca endoskop veya cerrahi solüsyonlar içerisinde kolonize olabilirler.

2010 yılında Mersin'de, çevre örneklerinde tüberküloz dışı mikobakterilerin izolasyonu ve tanımlanması amacıyla; hsp65 PRA ve "Line Prob" testinin (INNO-LiPA Mycobacteria; Innogenetics NV, Belçika) kullanıldığı bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, su örneklerinin %4,9 (5/101)'unda ve toprak örneklerinin %0,8 (1/124)'inde kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu ile TDM pozitifliği saptanırken, çiğ süt örneklerinin (0/40) hiç birisinde TDM tespit edilmemiştir. Su örneklerinden izole edilen TDM suşlarının üçü, PRA ve INNO-LiPA Mycobacteria yöntemleri ile *M. chelonae* tip III, ikisi *M. kansasii* tip II olarak; toprak örneğinden izole edilen bir suş ise *M. fortuitum* olarak tanımlanmıştır. Üreme olan beş su örneğinin ikisinin hastane musluk suyundan alınan örnekler olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle; hastanelerde su sistemleri ve tıbbi donanımların sürveyans kültürlerinin yapılmasının, izolatların tanımlanması ve tiplendirilmesinin, etkili kontrol önlemlerinin (uygun sterilizasyon/dezenfeksiyon yöntemleri, su sistemlerinin bakımı ve modernizasyonu vb.) alınmasının nozokomiyal TDM enfeksiyonlarını önleyebileceği sonucuna varmışlardır [62].

Günümüzde 125'den fazla TDM tanımlanmış olup bunların yaklaşık 60 tanesi şüpheli ya da bilinen bir hastalığa neden olmaktadır. Bunlar arasında pulmoner enfeksiyonlar, lenfadenitler, dissemine enfeksiyonlar, lokalize deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, tendon-kemik-eklem enfeksiyonları ve kateter enfeksiyonları bulunmaktadır [63].

Tüberküloz hastalığının tanısında ilk basamak aside dirençli boyama yöntemlerinin uygulanmasıdır. Mikroskobik incelemede aside dirençli basil görülmesi, klinik ve radyolojik bulgularda TB hastalığını destekliyorsa hemen anti tüberküloz ilaçlar ile tedaviye başlanmaktadır. Mikroskobik inceleme ile TDM ve MTK ayrımı yapılamamakta ve aynı zamanda TDM'lerin çoğu klasik anti tüberküloz ilaçlara dirençli bulunmaktadır. 1980'li yıllardan itibaren immün yetmezliğe neden olan Human immunodeficiency virus (HIV) gibi viral enfeksiyonlar ve uygulanan immün süpresif tedaviler nedeniyle TDM insidansı artmaya başlamıştır. Bu nedenlerle; TDM'lerin hızlı ve doğru şekilde tanımlanması, TDM

enfeksiyonlarının uygun şekilde tedavi edilmesi ve epidemiyolojik verilerin düzenli olarak tutulması günümüzde gerekli hale gelmiştir [34].

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Mikobakteriyoloji laboratuvarında *M. tuberculosis* kompleks üremesi saptanan hasta örneklerinin 2004 yılından 2010 yılına kadar oranları her yıl için sırasıyla; %3,6 - %4,2 - %4,9 - %4,6 - %2,6 - %4,3 - %3,5'tir. Tüberküloz dışı mikobakteri üremesi saptanan hasta örneklerinin yıllara göre dağılımı ise; %2 - %0,5 - %0,7 - %1,7 - %2,1 - %0,8 - %0,9' dur. Yedi yılın ortalaması ise MTK ve TDM için sırasıyla %3,9 ve %1,2 olarak saptanmıştır. Kurtoğlu ve arkadaşları, mikobakteriyoloji laboratuvarlarına tüberküloz ön tanısı ile gönderilen 1670 örnekle yapmış oldukları çalışmalarında %3,7 (63/1670) LJ ve/veya MGIT-960 ile kültür pozitifliği saptamışlar ve bunların; %3,1'i (53/1670) MTK, %0,6'sı (10/1670) TDM olarak sonuçlanmıştır. Zer ve arkadaşları ise 1,5 yıllık dönem içerisinde laboratuvarlarına tüberküloz tanısı amacıyla gelen 3831 klinik örneğin sonucunu, %5,63 (216/3831) MTK ve %0,078 (3/3831) TDM olarak bulmuşlardır [64,65]. Laboratuvarlar arası farklar; kullanılan kültür ve tanı yöntemlerine ve bu yöntemlerin duyarlılığına bağlı olarak değişebilmektedir. Ayrıca mikobakteriyoloji laboratuvarlarının kültür pozitiflik oranlarının bilinmesi önemlidir. Bu oranların beklenenden yüksek bulunması sonuçların şüpheyle karşılanmasını gerektirir. Özellikle BL ve BAL örneklerinde seri kontaminasyon görülmesi, yetersiz veya uygunsuz endoskop dekontaminasyonlarını göstermektedir.

Tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler; zahmetli, uzun zaman gerektirmekte ve sadece belli türleri birbirinden ayırt edebilmektedir. Aynı zamanda yeni mikobakteri türlerinin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadırlar. Bu yüzden günümüzde DNA dizi analizi, SSCP yöntemi, nükleik asit hibridizasyon yöntemleri, PRA ve DNA microarray yöntemleri TDM türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu moleküler yöntemler mikobakteri türlerinin tanımlanmasında hızlı ve güvenilirdir. Ancak hsp65 PRA yöntemi kolay uygulanması, ucuz olması, hızlı sonuç vermesi ve birçok mikobakteri türünü tanımlayabilmesi nedeniyle daha fazla tercih edilmektedir [22].

Çalışmamızda mikobakterilerin izolasyon, tanımlanma ve antibiyotik duyarlılıklarını saptanması amacıyla kullanılan BACTEC 460 TB ve MGIT 960 kültür sistemleri ile TDM olarak tanımlanan solunum yolu örneklerinin PRA yöntemiyle tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır. PRA yöntemini ilk kez 1992 yılında Plikaytis ve arkadaşları, mikobakterilerin hızlı bir şekilde tanımlanması için kullanmıştır [66]. 1993 yılında Telenti ve arkadaşları bu yöntemi modifiye ederek kullanmışlardır [56]. Bu yöntem; tüm mikobakterilerde bulunan hsp65'i kodlayan genin, *BstE* II ve *Hae* III restriksiyon enzimleriyle kesilmesi temeline

dayanmaktadır. Telenti ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada 33 farklı PRA paterni tanımlanmıştır. Bunların 19 tanesinin tek bir türe, 14 tanesinin ise beş türe (iki tip *Mycobacterium flavescens* ve *M. kansasii*, beş tip *M. gordonae*, iki alt tür *M. chelonae* ve 3 alt tür *M. fortuitum*) ait olduğunu bulmuşlardır. Daha sonraki yıllarda araştırmacılar tarafından PRA yöntemi kullanılarak birçok yeni PRA paternleri tanımlanmıştır. İlk hsp65 PRA çalışmalarında bant büyüklüğünün değerlendirilmesi için bilgisayar desteğinden yararlanılmıştır. Devallois ve arkadaşları, PRA için çok fazla sayıda PZT ürününe gereksinimi olan *M. kansasii* hariç tüm suşlarda, gözle değerlendirmenin yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda kesim paternleri gözle değerlendirilmiş ve herhangi bir zorlukla karşılaşılmamıştır [67]. Tüberküloz dışı mikobakteriler ile ilgili bilgi ve 174 mikobakteri türü ve alt türü için tanımlanmış olan 135 hsp65 PRA kesim paterni <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> internet adresinde bulunmaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız hsp65 PRA yöntemi tüm dünyada yaygın olarak kullanılan ve güvenilirliği yapılan birçok çalışmada gösterilmiş bir yöntemdir. Chimara ve arkadaşları; 2008 yılında klinik örneklerden izole edilen 434 TDM izolatı geleneksel fenotipik yöntemler ve hsp65 PRA yöntemiyle değerlendirmişler ve iki yöntemin sonuçlarını hsp65 nükleotid sekans analizi ile karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında, fenotipik yöntemler ile 63 (%15) izolat hiçbir şekilde tanımlanamamış, 33 (%7,6) izolat ise hatalı değerlendirilmiştir. Buna karşılık hsp65 PRA yöntemiyle sonuçlar $\geq$ %90 oranda doğru bulunmuş ve sadece 4 (%1,2) izolat yanlış olarak tanımlanmıştır [61]. Hafner ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış olduğu çalışmada da PRA yöntemi etkili bulunmuştur. Bu çalışmada; 126 izolata, hsp65 PRA yöntemi ile 16S rDNA sekans analizi uygulamışlar ve 120 (%95,2) izolatın PRA yöntemiyle doğru tanımlandığını bulmuşlardır [68]. Sajduda ve arkadaşları; 2010 yılında, 38 tane referans suşu PRA yöntemiyle değerlendirmiş, kesim paternlerinin gözlemlenen boyutlarının dizi analizine göre gerçekten ortalama 7 bp. daha küçük olduğunu görmüşlerdir. Buna rağmen PRA paternlerinin tekrarlanabilirliğinin ve sonuçların doğruluk oranlarının yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada 64 suşa kör olarak, geleneksel biyokimyasal testleri, ticari INNO-LiPA yöntemini ve DNA sekans analizini uygulamışlardır. Biyokimyasal testlerle 64 izolatın 14 tanesinde hatalı tanımlama yapıldığını, ancak %78 oranında doğru sonuç verdiğini bulmuşlar. Buna karşı PRA yöntemi ile elde edilen sonuçların INNO-LiPA ile %89 oranında, DNA sekans analizi ile %93,3 oranında uyum içerisinde olduğunu görmüşlerdir [69].

Çalışmamızda TDM'lerin tür dağılımı; *M. abscessus* tip 1 (69), *M. xenopi* (26), *M. fortuitum* (14), *M. porcinum* tip 1, *M. septicum* tip 1, *M. peregrinum* tip 2 (14), *M. simiae* tip 5, *M. lentiflavum* tip 1, *M. florentinum* tip 1 (5), *M. intracellulare* tip 1, *M. chimaera* tip 1 (5),

M. genavense tip 2, *M. simiae* tip 1 (4), *M. chelonae* (2), *M. novocastrense* (1), *M. gordonae* tip 6 (1), *M. colombiense* tip 1, *M. avium s. avium* tip 2 (1), *M. massiliense* tip 1, *M. bolletii* tip 1, *M. abscessus* tip2 (2), *M. avium s. avium* tip1, *M. avium s. paratuberculosis* tip 1, *M. avium s. silvaticum* tip 1 (2) olarak sonuçlandı. On TDM izolatu ise hsp65 PRA yöntemi ile tanımlanamadı. Ergin ve arkadaşları, 1999 yılında çeşitli örneklerden izole edilen 102 mikobakteri suşunu hsp 65 PRA yöntemi ile çalışmışlardır. Bu çalışmada 80 örnek (%78,4) *M. tuberculosis* kompleks, 22 örnek (%21,5) TDM olarak tanımlanmıştır. Tüberküloz dışı mikobakterilerin tür dağılımı; *M. gordonae* I (4), *M. chelonae* (3), *M. gordonae* III (2), *M. gordonae* IV (2), *M. avium* (2) , *M. peregrinum* (2), *M. fortuitum* (1), *M. flavescens* (1) , *M. malmoense* (1), *M. mucogenicum* (1) şeklinde bulunmuştur. TDM suşlarından üçü *Hae* III enzimi kesimi sonucu buldukları paternler tür tanımlama cetvelinde olmadığı için bu çalışmada tanımlanamamıştır [70]. 2003 yılında Gülhane Askeri Tıp Akademisinde, hasta örneklerinden izole edilen tüberküloz dışı mikobakterilerin moleküler yöntemler ile tanımlandığı çalışmada, 17 TDM suşu, hsp65 PRA yöntemi kullanılarak tür düzeyinde tanımlanmıştır. Bu çalışmada ise, *M. gordonae* tip I (3), *M. gordonae* tip III (3), *M. gordonae* tip IV (1), *M. gordonae* tip VII (4), *M. abscessus* tip I (1), *M. intracellulare* tip I (1), *M. nonchromogenicum* tip I (1), *M. thermoresistibile* (1), *M. genavense* (2) bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmalardaki verilere göre TDM türlerinin dağılımı coğrafi bölgelere göre değişmektedir. Çevresel koşullardaki (su ve toprak kaynakları) baskın TDM türleri de bölgesel farklılıkların temelini oluşturmaktadır.

Çalışmamızda %44 oranıyla en sık saptanan *M. abscessus*; pigment yapmayan hızlı üreyen mikobakterilerdendir ve Runyon sınıflamasında grup IV' de yer almaktadır. Kültür ortamında yedi gün içerisinde kolonileri gözle görülür hale gelmektedir. *M. abscessus*; lokalize yumuşak doku enfeksiyonları, pulmoner ve dissemine enfeksiyonlar gibi çeşitli klinik durumlara neden olmaktadır. Yumuşak doku enfeksiyonları genellikle kontamine olmuş enfekte malzeme, steril olmayan cerrahi, enjeksiyonlar, yabancı cisim ve kulak tüpü uygulamalarından sonra görülebilmektedir. *M. abscessus*'un neden olduğu pulmoner hastalıklar asemptomatik olabildiği gibi önemli morbidite ve mortalitenin eşlik ettiği şiddetli bronşektazi ve kaviter akciğer hastalığı şeklinde de görülebilir. Hastalar genellikle yaşlı, sigara içmeyen ve daha önceden herhangi bir akciğer hastalığı olmayan kadınlardır. *M. abscessus* hızlı üreyen mikobakterilerin neden olduğu kronik akciğer hastalıklarının %80'nini oluşturmaktadır [71].

M. abscessus in vitro olarak birçok ilaca karşı dirençlidir ve hızlı üreyen mikobakteriler içinde en dirençli olarak bilinen türdür. Tüberküloz tedavisinde kullanılan

birinci seçenек antitüberküloz ilaçlara karşı doğal olarak dirençlidir. Genellikle parenteral olarak kullanılan ilaçlardan; amikasin, sefoksitin ve imipenem, oral makrolidlerden klaritromisin ve azitromisine invitro olarak duyarlıdır. Bunların uzun süre tek başlarına kullanılması direnç gelişmesine neden olabileceği için, tedavi sırasında diğer ilaçlar ile kombine edilerek kullanılmalıdır. ATS ve Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (*Infectious Diseases Society of America* - IDSA), kombine tedavi olarak; intravenöz amikasin ile sefoksitin veya imipenem ile oral makrolidlerin kullanılmasını tavsiye etmektedir [72, 73].

Çalışmamızda %17 oranıyla 2. sıklıkta bulunan *M. xenopi*; Runyon sınıflamasında grup III' de yer alan, fotokromojen olmayan yavaş üreyen mikobakterilerdendir. Optimum 45°C'de üremektedir. Hastanelerdeki duşlar, sıcak su sistemleri ve depoları *M. xenopi* ile gelişebilecek nozokomiyal enfeksiyonlar için potansiyel kaynakları oluşturmaktadır. *M. tuberculosis* kompleks türlerinin ve *M. avium intracellulare*'nin kliniğine benzer şekilde akciğer hastalığına neden olmaktadır. Ekstra pulmoner (kemik, eklem ve kas) tutulumları ve dissemine enfeksiyonları daha az sıklıkla rapor edilmektedir. Ayrıca kontamine bronkoskoplar ile ilişkili yalancı *M. xenopi* enfeksiyonları da görülebilmektedir.

Mycobacterium xenopi ile meydana gelen enfeksiyonlarının tedavisi zaman alıcı ve karmaşık olduğu için, gerçek ve yalancı enfeksiyonların ayrımı çok önemlidir. Birinci seçenек antitüberküloz ilaçlara duyarlı olsa da bazı suşların değişen oranlarda RIF, EMB ve düşük düzey INH direnci bildirilmektedir. *M. xenopi* enfeksiyonlarının tedavisinin temelini; klaritromisin, EMB ve RIF kombinasyonları oluşturmaktadır. Negatif balgam kültürü elde edilene kadar, 12 ay süre ile tedaviye devam edilmelidir. Medikal tedaviye yanıt vermeyen, yeterli akciğer fonksiyonu olan seçilmiş olgularda cerrahi yaklaşım uygulanabilmektedir. Cerrahi tedaviye kinolanlar ve klaritromisin eklenmesi başarı şansını arttırmaktadır. Ekstra pulmoner tutulumlarda da benzer yaklaşımlar uygulanmaktadır. Yumuşak doku enfeksiyonlarında cerrahi debridman önemlidir [20, 74].

Tüberküloz dışı mikobakterilerin neden olduğu akciğer hastalıklarının tedavisi uzun süren ve birçok ilacın birlikte kullanıldığı bir süreç olduğundan maliyeti yüksektir. Leber ve arkadaşları 2011 yılında Kanada'da yaptıkları bir çalışmada, TDM'lerin neden olduğu akciğer hastalıklarının tedavi maliyetini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada ilaç seçiminin tedavi maliyetini arttıran temel unsurlardan biri olduğu vurgulanmış, oral olarak kullanılan florokinolon, makrolid ve rifampin'in en pahalı ilaçlar olduğu gösterilmiştir. İntravenöz (IV) ilaçlar ise oral ilaçlara göre daha da pahalı olduğu belirlenmiştir. Yapmış oldukları çok değişkenli analizler ile; *M. abscessus* ve *M. xenopi* ile meydana gelen enfeksiyonların ve bunların IV tedavilerinin aylık maliyeti arttırdığı sonucuna varmışlardır. Tedavi maliyetini

düşürmek amacıyla daha ucuz alternatif tedaviler ve IV tedavinin sadece gerektiğinde kullanılmasını önermişlerdir [75]. Bu nedenle TDM'lerin tiplendirilmesi; uygun ilaç kullanımı ile klinik açıdan etkin bir tedavi ve uygun maliyet sağlama açısından önemlidir.

Çalışmamızda %9 sıklıkla bulunan *Mycobacterium fortuitum*; Runyon sınıflamasında grup IV'de yer alan, hızlı üreyen mikobakterilerdendir. Su ve toprakta yaygın olarak bulunmaktadır. *M. fortuitum*'un neden olduğu akciğer hastalığı hemen her zaman gastrointestinal reflü ve kronik kusma ile bir aradadır. Genellikle çeşitli antimikrobiyal ajanlara duyarlıdır. Bunlar arasında; makrolidler, kinolonlar, doksisisiklin, minosiklin ve sülfonamidler sayılabilir. 12 ay boyunca sürekli bir kültür negatifliği ile birlikte in-vitro duyarlılığı olan iki ilaçla tedavi önerilmektedir [20].

Şimşek ve arkadaşları; 2009-2010 yıllarında ulusal tüberküloz referans laboratuvarında tespit edilen tüberküloz dışı mikobakteri etkenlerinin dağılımını line prob assay ile değerlendirmişler, çalışmamızla uyumlu olarak hızlı üreyen türleri (*M. abscessus* ve *M. fortuitum*) en sık (%55.7) karşılaşılan tüberküloz dışı mikobakteri etkeni olarak saptamışlardır [76]. Benzer şekilde Wang ve arkadaşları; 2005 yılında Singapur'da, 39 adet hızlı üreyen mikobakteriyi PRA yöntemiyle tiplendirmişler ve *M. abscessus* ve *M. fortuitum*'u %89,7 oranında en sık bulmuşlardır. Biyokimyasal testler ve diğer araştırmacıların sonuçlarıyla karşılaştırdıklarında PRA yöntemiyle %100 doğru sonuç aldıklarını görmüşlerdir. Hızlı üreyen mikobakteriler ile enfekte hastaların tanı ve tedavilerini yönlendirmede PRA yönteminin hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır [77].

Çalışmamızda kullandığımız PRA yönteminin maliyeti hasta başına 20-25 dolar hesaplandı. 2011 yılı Sosyal Güvenlik Kurumu Sağlık Uygulama Tebliği'nde PZT ile mikobakteri tiplendirilmesi 84,80 TL'dir (50-55 dolar). Bu verilerle uygulanacak test maliyetinin karşılandığı görülmektedir. Hsp65 PRA yöntemi ile ekonomik olarak mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması yapılarak gereksiz ilaç kullanımı engellenecek, doğru tedavinin uygulanması sağlanacaktır.

Mikobakterilerin tiplendirilmesi amacıyla kullanılan PRA yönteminde spesifik primerler kullanılarak birçok gen bölgesi hedef alınabilmektedir. Bunlar arasında, 16S rRNA, hsp65, rpoB, 16S-23S rRNA ITS, gyr B ve dnaJ gen bölgeleri bulunmaktadır. Ancak 16S-23S rRNA ITS, hsp65 ve rpoB en çok çalışılan ve geliştirilen gen bölgeleridir.

Ong ve arkadaşları; 2010 yılında Malezya'da mikobakterileri tiplendirmek için hsp65 ve rpoB gen bölgelerini hedefleyen PRA yöntemini kullanarak 90 adet klinik izolatu çalışmışlardır (20 tanesi MTK, 47 tanesi hızlı üreyen mikobakteri, 23 tanesi yavaş üreyen

mikobakteri). *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin hepsini bu iki gen bölgesini hedef alan PRA ile doğru olarak tanımlamışlardır. Hızlı üreyen mikobakterileri hsp65 ve rpoB PRA ile sırasıyla %89,4 ve %95,7 yavaş üreyen mikobakterileride sırasıyla %91,3 ve %52,5 oranında doğru olarak tanımlamışlardır. On altı izolatin uyumsuz olan PRA sonuçlarını 16S rRNA ve hsp65 gen dizi analizi yaparak sonuçlandırmışlardır. Elde ettikleri bulgular neticesinde, mikobakterilerin, özelliklede yavaş üreyen mikobakterilerin tiplendirilmesinde hsp65 PRA yönteminin rpoB PRA'dan daha başarılı olduğu sonucuna varmışlardır [78].

Hsp65 PRA yönteminin en önemli dezavantajı; benzer büyüklükte bant paternine sahip olan mikobakteri türlerini her zaman ayırt edememesi ve küçük bant paternlerinin (özellikle *Hae III* ile kesilen) değerlendirilmesinin zor olmasıdır [79]. Çalışmamızda da 10 adet TDM izolatu *Hae III* enzimi ile kesimleri değerlendirilemediği için tanımlanamadı. Bazı araştırmacılar 60 bp. den küçük kesim paternlerini primer veya primer dimer bandı olma ihtimali nedeniyle göz ardı etmişlerdir. Brunello ve arkadaşları ise bazı mikobakteri türlerinin tanımlanmasında 60 bp. ve altındaki kesim paternlerini kullanmışlardır. Çalışmamızda da 50 bp. altındaki kesim paternleri değerlendirilmedi. Bu durum sonuçlarımızda herhangi bir değişikliğe neden olmadı.

Sonuç olarak, doğada çok yaygın olarak bulunan tüberküloz dışı mikobakteriler immünsüpresif tedavi veya immünsüpresif hastalıklar nedeniyle, günümüzde artan sıklıkta ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Antimikrobiyal duyarlılıklarındaki farklılıklar nedeniyle etkin ve doğru şekilde tedavi edilmeleri aynı zamanda epidemiyolojik açıdan verilerin elde edilmesi için TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanması önemlidir. Bu amaçla kullanılan hsp65 PRA yöntemi, kolay uygulanabilen, hızlı, güvenilir ve ucuz bir yöntemdir.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Günümüzde HIV gibi viral enfeksiyonlar, kortikosteroid kullanımı, kollajen vasküler hastalık, lösemi, lenfoma gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda TDM'ler giderek artan sıklıkta görülmektedir.
2. TDM'lerin neden olduğu akciğer hastalığının klinik olarak TB'ye benzemesi ve Mikobakteriyoloji laboratuvarlarına gönderilen örneklerde ARB görülmesi nedeniyle hemen tedaviye başlanmaktadır. Tüberküloz dışı mikobakterilerin klasik antitüberküloz ilaçlara dirençli olması tedavi başarısızlığına neden olmaktadır. Bu durum hem hastaya yararı olmayan ilaçların gereksiz kullanılmasına, hem de hastanede kalış süresinin uzamasına neden olarak hastane enfeksiyon riskinin artmasına ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle tedaviye başlanmadan önce mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca epidemiyolojik açıdan sağlıklı verilerin elde edilmesi için de gereklidir.
3. Tüberküloz dışı mikobakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavileri, türler arasında farklılık göstermektedir. Bu nedenle TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanması klinik ve ekonomik açıdan duyarlı olduğu bilinen ilaçlarla etkin tedavilerine olanak sağlar..
4. Doğada her yerde, özellikle sularda bulunan TDM'ler, laboratuvarlarda kullanılan tamponlar ve suları kontamine ederek kültürlerde yalancı pozitifliklere neden olabilmektedir. Bu tür yalancı enfeksiyonların belirlenmesiyle kişilerin gereksiz tedavi almaları önlenabilir.
5. Tüberküloz dışı mikobakterilerin tanımlamasında kullanılan fenotipik yöntemler zahmetli, uzun zaman gerektirmekte ve sadece belli türleri ayırt edebilmektedir. Aynı zamanda yeni mikobakteri türlerinin tanımlanmasında da yetersiz kalmaktadırlar. Bu nedenle günümüzde TDM'lerin tanımlamasında moleküler yöntemler daha sık kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız PRA yönteminin maliyeti, 2011 yılı Sosyal Güvenlik Kurumu Sağlık Uygulama Tebliği'ne göre belirlenen test maliyetini karşılamaktadır. Hsp 65 PRA yöntemi; ucuz olması yanı sıra, kolay uygulanabilmesi, hızlı ve güvenilir sonuç vermesi nedeniyle TDM'lerin tanımlamasında günümüzde sık kullanılan bir yöntemdir.

9. KAYNAKLAR

1. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology 9.Baskı ed. Klinik Mikrobioloji, Başustaoğlu A.Vol. 36. 2009, Ankara: Atlas Kitapçılık. 543.
2. Seber E. Tüberkülozun Dünü. Ankem Dergisi. 2010;24(2): 52-60.
3. Barış Yİ. Dünya’da Tüberkülozun Tarihçesi. Toraks Dergisi. 2002;3(3): 338-340.
4. Clark GA, Kelley MA, Grange JM, Hill MC. The evolution of mycobacterial disease in human populations: a reevaluation. Curr Anthropol. 1987;28(1): 45-62.
5. Leão SC. History in Tuberculosis 2007. Ed. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007;Brazil. 25-52.
6. Karlıkaya C. Tüberküloz Ders Notları. 1998; <http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>
7. Ligon BL. Robert Koch: Nobel Laureate and controversial figure in tuberculin research. Semin Pediatr Infect Dis. 2002;13(4): 289-299.
8. Fındık S. Yetişkinlerde Tüberküloz Tedavisi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun.2003.
9. Billinger ME, Prevots DR, Olivier KN, Viboud C, de Oca RM, Steiner C, Holland SM. Nontuberculous mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States,1998-2005. Emerg Infect Dis. 2009;15(10): 1562-9.
10. Tabarsi P, Mansouri D, Baghaei P, Farnia P, Mansouri N, Chitsaz E, Sheikholeslam F, Marjani M, Rouhani N, Mirsaeidi M, Alipanah N, Amiri M, Masjedi MR. Nontuberculoous mycobacteria among patients who are suspected for multidrug-resistant tuberculosis-need for earlier identification of nontuberculosis mycobacteria. Am J Med Sci. 2009;337(3): 182-4.
11. Yüce A. Nontüberküloz Mikobakteri İnfeksiyonlarının Klinik Önemi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun.2003.
12. Currie CS, Williams BG, Cheng RC, Dye, C. Tuberculosis epidemics driven by HIV: is prevention beter than cure? AIDS. 2003;17(17): 2501-8.
13. Özkara Ş, Ecevit H. Aktaş Z, Özkan S. Verem Savaş Daire Başkanlığı, Dünyada Durum. Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. Ankara. 2003; 7-9
14. Kara B. Tüberkülozun Kontrolünde Başlıca Sorunlardan Biri: Tedaviye Uyum. TAF Prev Med Bull.2009;8(1): 75-82.

15. *World Health Organization: Global Tuberculosis Control,WHO Report 2010, WHO/HTM/TB/2010.7.*
16. Bozkurt H, Özkara Ş, Türkkan MH, Onbaşıoğlu SM, Güllü Ü, Yıldırım A, Baykal F. Verem Savaşı Daire Başkanlığı, Türkiye’de Verem Savaşı 2010 Raporu. Ankara.2010.
17. Cook JL. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic enviromental pathogens for predisposed hosts. Br Med Bull.2010;96: 45-59.
18. Biçmen C, Coşkun M, Gündüz AT, Şenol G, Çırak AK, Tibet G. Nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: causative agent or not? New Microbiol. 2010;33(4): 399-403.
19. Dailloux M, Abalain ML, Laurain C, Lebrun L, Loos-Ayav C, Lozniewski A, Maugein J. Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients. Eur Respir J, 2006;28(6): 1211-5.
20. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Lademarco MF, Iseman M, Oliver K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ, Winthrop K. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(4): 367-416.
21. Marras TK, Chedore P, Ying AM, Jamieson F. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. Thorax. 2007;62(8):661-6.
22. da Costa AR, Lopes ML, Furlaneto IP, de Sousa MS, Lima KV. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;68(4): 390-4.
23. http://health.state.tn.us/images/TB_Smear.jpg.
24. Barrera L. The Basics of Clinical Bacteriology. in Tuberculosis 2007. Ed. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007;Brazil. 93-112.
25. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 2003;83(1-3): 91-7.
26. Köksal F, Yaman A. Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun.2003.
27. Pfyffer GE, Brown BA, Swenson JM, Wallace RJ Jr. Mycobacterium: General Characteristics, Isolation and Staining Procedures. In: Murray. PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC (Eds:) Manual of Clinical Microbiology 8th edition, ASM Pres, Washington DC, 2003.

28. Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. Clin Infect Dis, 2001;33(8): 1363-74.
29. Piersimoni C, Scarparo C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. Emerg Infect Dis, 2009;15(9):1351-8.
30. Bitirgen M, Yenen OŞ, Tekeli E, Ekinci E, Fakı İ, Akciğer Tüberkülozlu Hastalarda Balgamda Asidorezistan Basil (ARB) Pozitifliği ve Balgam Kültürü Sonuçları. Türkiye Klinikleri Araştırma Dergisi. 1988;6:5.
31. Woods GL, Washington JA. 2nd, Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis: review of microbiologic and clinical aspects. Rev Infect Dis. 1987;9(2): 275-94.
32. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenber PC, Winn WC. Mycobacteria In: Koneman EW. The Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed Philadelphia: JB Lipincott Co. 2006: 1090-1124.
33. Çelik N, Eyüboğlu AFO. Tüberküloz Dışı Mikobakteriyel Enfeksiyonlar. Türkiye Klinikleri, Akciğer Arşivi. 2000;1: 31-41
34. Alp A. Non-Tüberküloz Mikobakteri Enfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı ve Duyarlılık Testleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun.2003.
35. Özkütük N. Klinik Materyalin Hastadan Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun.2003.
36. Ersöz G, Arslan G. Örneklerin İşlemlenmesi ve Kültür yöntemleri. IV. Tüberküloz Sempozyumu Kitabı. Malatya. İnönü Üniversitesi. 2005: 156-160.
37. World Health Organisation (1998) WHO Laboratory Services in Tuberculosis Control. Part II: Microscopy. WHO/TB/98.258. Geneva, Switzerland.
38. Sarıgüzel N. Direk Mikroskopi Teknikleri ve Değerlendirilmesi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun.2003.
39. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a Guide for the level 111 laboratory U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga.1985.
40. Sürücüoğlu S. Mikobakteri Enfeksiyonlarının Tanısında Klasik Yöntemler, Standardizasyonu ve Önemi. Klimik 2003 XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi.

41. Baylan O. Tüberkülozun kültüre dayalı tanı yöntemleri Mikrobiyol Bul. 2005;39: 107-1.
42. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). . Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Proposed Guideline. CSLI document M48-P, Pennsylvania, USA, 2007.
43. Uzun M. Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun.2003.
44. Isenberg DH. Liquid media. Essentials procedures for clinical microbiology. Washington, D.C: ASM Pres. 2000: 183-187.
45. Köksalan OK, Aydın MD, Eraslan S, Bekiroğlu N. Reliability of cord formation in BACTEC 12B/13A media for presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis complex in laboratories with a high prevalence of Mycobacterium tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21(4): 314-7.
46. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. J Clin Microbiol, 2004;42(5): 2321-5.
47. Piersimoni C, Nista D, Bornigia S, Gherardi G. Unreliable detection of *Mycobacterium xenopi* by the nonradiometric Bactec MGIT 960 culture system. J Clin Microbiol. 2009;47(3): 804-6.
48. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology 9.Baskı ed. Klinik Mikrobiyoloji, Başustaoğlu A.Vol. 37. 2009, Ankara: Atlas Kitapçılık. 573.
49. Collins T, Levett PN. Radiometric studies on the use of selective inhibitors in the identification of Mycobacterium spp. J Med Microbiol. 1989;30(3): 175-81.
50. Somoskovi A, Mester J, Hale YM, Parsons LM, Salfinger M. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. Clin Chest Med. 2002;23(3): 585-97.
51. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chem, 2001;47(5): 809-14.
52. Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. J Microbiol Methods. 2008;75(1): 1-11.
53. Lee AS, Jelfs P, Sintchenko V, Gilbert GL. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. J Med Microbiol. 2009;58(7): 900-4.

54. Gitti Z, Neonakis I, Fanti G, Kontos F, Maraki S, Tselentis Y. Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS assays to analyze 76 nontuberculous mycobacterial isolates from Greece. *J Clin Microbiol.* 2006;44(6): 2244-6.
55. Cheunoy W, Prammananan T, Chaiprasert A, Foongladda S. Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: two amplified targets, hsp65 and rpoB, for identification of cultured mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;51(3): 165-71.
56. Telenti A, marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2): 175-8.
57. Bulut Y, Doymaz MZ. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ve Mikrobiyolojideki Önemi. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kitabı*, ed. R. Durmaz. 2001.
58. Gilman LM, Gunton J, Turenne CY, Wolfe J, Kabani AM. Identification of Mycobacterium species by multiple-fluorescence PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9): 3085-91.
59. Özyurt M. Tüberkülozun laboratuvar tanısında kullanılan moleküler ticari tanı sistemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun.2003.
60. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):319-54.
61. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, Leao SC. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol.* 2008;8: 48.
62. Cafri U, Arslan G, Direkel Ş, Tarhan G, Ceyhan İ, Emekdaş G. Çevre Örneklerinden Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44: 395-403.
63. Jarzembowski JA, Young MB. Nontuberculous mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(8): 1333-41.
64. Kurtoğlu MG, Özdemir M, Keşli R, Özalp B, Baysal B. Tüberküloz Şüpheli Hastalardan Mycobacterium tuberculosis Kompleks İzolasyon Oranı ve Suşların BACTEC™ NAP ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Rapid™ Testleri ile Tanımlanması. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(2): 266-273

65. Zer Y, Çiçek H, Mehli M, Bayıl S, Balcı İ. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2004-2006 Yılları Arasında Tüberküloz Hastalarından Soyutlanan Mikobakterilerin Antitüberküloz İlaç Direnci. *Klinik Derg.* 2007;20(1): 20-22.
66. Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA, Shinnick TM. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1992;30(7): 1815-22.
67. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11): 2969-73.
68. Hafner B, Haag H, Geiss HK, Nolte O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new hsp65 restriction fragment length polymorphism patterns. *Mol Cell Probes.* 2004;18(1): 59-65.
69. Sajduda A, Martin A, Portaels F, Palomino JC. hsp65 PCR-restriction analysis (PRA) with capillary electrophoresis in comparison to three other methods for identification of *Mycobacterium* species. *J Microbiol Methods.* 2010;80(2): 190-7.
70. Ergin A, Kocagöz T, Us D, Günalp A. Polimeraz zincir reaksiyonu - restriksiyon enzim analizi ile mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması. *Mikrobiyoloji Bülteni.* 1999;33(4): 251-261.
71. Jarand J, Levin A, Zhang L, Huitt G, Mitchel JD, Daley CL. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. *Clin Infect Dis.* 52(5): 565-71.
72. Huang YC, Liu MF, Shen GH, Lin CF, Kao CC, Liu PY, Shi ZY. Clinical outcome of *Mycobacterium abscessus* infection and antimicrobial susceptibility testing. *J Microbiol Immunol Infect.* 43(5): 401-6.
73. Jeon K, Kwon OJ, Lee NY, Kim BJ, Kook YH, Lee SH, Park YK, Kim CK, Koh WJ. Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(9): 896-902.
74. Varadi RG, Marras TK. Pulmonary *Mycobacterium xenopi* infection in non-HIV-infected patients: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13(10): 1210-8.
75. Leber A, Marras TK. The cost of medical management of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in Ontario, Canada. *Eur Respir J.* 2011;37(5): 1158-65.

76. Şimşek H, Albayrak N, Arslantürk A, Ceyhan İ. 2009-2010 Yıllarında ulusal tüberküloz referans laboratuvarında tespit edilen tüberküloz dışı mikobakteri etkenlerinin dağılımının irdelenmesi XXVI. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi. 23-26 Mart 2011. Adana. Program ve Bildiri Özet Kitabı.
77. Wang SX, Tay L, Sng LH. Rapid Identification of pathogenic rapidly growing mycobacteria by PCR-restriction endonuclease analysis. *Ann Acad Med Singapore*. 2005;34(1): 137-40.
78. Ong CS, Ngeow YF, Yap SF, Tay ST. Evaluation of PCR-RFLP analysis targeting hsp65 and rpoB genes for the typing of mycobacterial isolates in Malaysia. *J Med Microbiol*. 2010;59(11): 1311-6.
79. Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, Gaillard JL, Pierre-Audiger C. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1999;37(3): 852-7.