

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM FORTUITUM* İZOLATLARINDA BİYOFİLM
OLUŞUMU VE KLARİTROMİSİN DUYARLILIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Berke KURUMANASTIRLI

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MYCOBACTERIUM FORTUITUM İZOLATLARINDA BİYOFİLM
OLUŞUMU VE KLARİTROMİSİN DUYARLILIĞININ
ARAŞTIRILMASI

Dr. Berke KURUMANASTIRLI

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Zeynep SARIBAŞ

ANKARA

2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel ve manevi desteğinden faydalandığım tez danışmanım ve tez projemin yürütücüsü Prof. Dr. Zeynep Sarıbaş'a tüm desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sevtap Arıkan Akdağlı'ya, biyofilm çalışmalarında verdikleri karkıllardan dolayı Prof. Dr. Özgen Eser, Prof. Dr. Banu Sancak ve Prof. Dr. Dolunay Gülmez'e, duyarlılık çalışmalarına destek veren Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz'a ve diğer tüm hocalarıma teşekkür ederim. Tez çalışmalarında manevi desteklerinden dolayı Uzm. Dr. İlke Toker Önder, Uzm. Dr. Neşe İnal, Uzm. Dr. Ekin Kırbas, Uzm. Dr. Aytekin Fırtına, Arş. Gör. MSc. Öznur Gürpınar, Arş. Gör. Dr. Tuğba Küçükbahar ve Arş. Gör. Dr. Aylin İrem Ocaklı'ya teşekkür ederim. Tez projemde yer alan Prof. Dr. Alpaslan Alp'e özellikle tez projemin moleküler çalışmalarında vermiş olduğu destekten dolayı teşekkür ederim. Bu tez projesinde kullanmış olduğum *Mycobacterium fortuitum* izolatlarını benimle paylaşan İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü öğretim üyesi Doç. Dr. Orhan Kaya Köksalan'a ve laboratuvar ekibine, Ankara Atatürk Sanatoryum Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Tüberküloz Birimi'ne teşekkür ederim. Ayrıca manevi desteklerinden dolayı Ankara Halk Sağlığı Laboratuvarı Tüberküloz Birimi sorumlusu Uzm. Dr. Ahmet Arslantürk'e teşekkür ederim. Son olarak tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan ve sonsuz manevi desteklerini hissettiğim başta annem olmak üzere tüm aileme çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması (proje no: THD-2023-20584), Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.

ÖZET

Kurumanastırlı Berke, *Mycobacterium fortuitum* İzolatlarında Biyofilm Oluşumu ve Klaritromisin Duyarlılığının Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2024.

Mycobacterium fortuitum, hızlı üreyen tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) türlerinden biridir. Dış ortamda çok yaygın bulunan bu bakteri özellikle immünsupresif hastalarda nazokomiyal enfeksiyonlar ile ilişkilendirilmiştir. *M. fortuitum*'un çeşitli yüzeylerde (cerrahi alet, implant, vb.) biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir. Biyofilm mukopolisakkarid tabaka ve mikroorganizma topluluğundan meydana gelen yüzey oluşumudur. Biyofilm tabaka içerisindeki özelleşmiş hücrelerin yükselmiş antimikrobiyal minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerine bağlı olarak tedavi başarısızlığına neden olabileceği gösterilmiştir. *M. fortuitum* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antimikrobiyel ajanlardan biri olan makrolid grubu üyesi klaritromisine karşı *erm (39)* genindeki mutasyonlar indüklenebilir makrolid direnci ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda, 40 adet *M. fortuitum* suşunda, standart sıvı mikrodilüsyon testi ile klaritromisin duyarlılığının belirlenmesi, biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılması ve *erm (39)* geninde mutasyon varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Yetmiş ikinci saatte yapılan değerlendirmede tüm izolatlar duyarlı, 14. günde izolatların %65'i indüklenebilir makrolid dirençli olarak raporlanmıştır. Biyofilm oluşumunun araştırılması için kristal viyole yöntemi kullanılmıştır ve iki izolat (%5) "orta biyofilm pozitif", 38 izolat (%95) "zayıf biyofilm pozitif" olarak rapor edilmiştir. Sanger dizileme yöntemi kullanılarak *erm (39)* geninde mutasyon varlığı araştırılmıştır. İzolatların tamamında PZR'de, *erm (39)* geni pozitif bulunmuştur. Dünyada ve ülkemizde *M. fortuitum*'u ele alan duyarlılık ve biyofilm çalışmaları oldukça sınırlı sayıdadır. Elde edilen sonuçlar ile *M. fortuitum* enfeksiyonlarında daha bilinçli ve etkili bir tedavi prensibine katkıda bulunmayı hedeflemekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium fortuitum*, klaritromisin, biyofilm, *erm*

Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi
Proje No: THD-2023-20584

ABSTRACT

Kurumanastırılı Berke, Investigation of Biofilm Formation and Clarithromycin Susceptibility in *Mycobacterium fortuitum* Isolates, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Thesis in Medical Microbiology, Ankara, 2024. *Mycobacterium fortuitum* is a rapid growing non-tuberculous mycobacteria (NTM) species. This species which is very common in the environment, has been associated with nosocomial infections, especially in immunosuppressed patients. *M. fortuitum* can form biofilm on various surfaces (surgical instruments, implants, etc.). Biofilm is a surface formation consisting of a mucopolysaccharide layer and a population of microorganisms. Specialized cells within the biofilm which have high antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) values may cause treatment failures. Mutations in the *erm (39)* gene have been associated with inducible macrolide resistance against clarithromycin, which is a member of the macrolide antibiotic group used in the treatment of *M. fortuitum* infections. In our study, we aimed to investigate clarithromycin susceptibility by standard broth microdilution method, biofilm formation and *erm (39)* gene mutations in 40 *M. fortuitum* isolates. While all isolates were found to be susceptible at the 72nd hour, 65% of the isolates were reported as inducible macrolide resistance on day 14. The crystal violet method was used to investigate biofilm formation and two isolates (5%) were reported as “moderate biofilm positive” and 38 isolates (95%) as “weak biofilm positive”. Mutations in the *erm (39)* gene were investigated using the Sanger sequencing method. The *erm (39)* gene was found positive in PCR in all isolates. There are a limited number of studies on susceptibility and biofilm testings of *M. fortuitum* in the world and in our country as well. Thanks to our findings, we aim to contribute to a more conscious and effective treatment principle in *M. fortuitum* infections.

Keywords: *Mycobacterium fortuitum*, clarithromycin, biofilm, *erm*

Supporting Organisation: Hacettepe University Scientific Research Project Unit
Project No: THD-2023-20584

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TABLolar	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikobakterilerin Tarihçesi	3
2.2. Mikobakterilerin Sınıflaması, Genel Özellikleri.....	4
2.3. Mikobakterilerin Virülans Faktörleri	9
2.4. Mikobakterilerin İmmünpatogenezi	11
2.5. TDM Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	12
2.6. TDM Enfeksiyonlarının Klinik Patolojisi	13
2.7. Biyofilm Genel Özellikleri	15
2.8. Mikobakterilerde Biyofilm Oluşumu	16
2.9. <i>M. fortuitum</i> -Genel Özellikleri	17
2.10. TDM ve <i>M. fortuitum</i> Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	18
2.11. TDM-Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	22
2.12. <i>M. fortuitum</i> Antimikrobiyal Duyarlılık Profili-Tedavi	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. <i>M. fortuitum</i> İzolatları	25
3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:	25
3.3. <i>M. fortuitum</i> İzolatlarının Besiyerine Ekimi ve Üretilmesi.....	27
3.4. <i>M. fortuitum</i> İzolatlarının Kinyoun Yöntemiyle Boyanması.....	28
3.5. <i>M. fortuitum</i> İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	28
3.6. <i>M. fortuitum</i> İzolatlarında Biyofilm Oluşumunun Araştırılması	29
3.7. Sanger Dizi Analizi	30
3.7.1. DNA İzolasyonu	30
3.7.2. Hedef DNA'nın PZR İle Çoğaltılması ve İşaretlenmesi	31
3.7.3. Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulanması	32
3.7.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	33
3.7.5. DNA Miktar Tayini.....	34
3.7.6. Dizileme Reaksiyonu	34
3.7.7. Dizileme Aşaması	35

3.7.8. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	36
4. BULGULAR	38
4.1. Klaritromisin Duyarlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	38
4.2. Biyofilm Sonuçlarının Değerlendirilmesi	41
4.3. PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	43
4.4. Sanger Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	44
4.5. İstatistiksel Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	48
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
7. KAYNAKLAR.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
bç	Baz çifti
gr	Gram
L	Litre
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ARB	Aside dirençli basil
ATS/IDSA	<i>American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America</i> (=Amerikan Toraks Derneği/Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği)
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (=Temel Yerel Hizalama Arama Aracı)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (=Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
M.Ö.	Milattan önce
CLA	Klaritromisin
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (=Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
d-NTP	deoksinükleotid trifosfat
dd-NTP	dideoksinükleotid trifosfat
d-ATP	deoksiadenozin trifosfat
d-CTP	deoksisitidin trifosfat
d-GTP	deoksiguanozin trifosfat
d-TTP	deoksitimidin trifosfat
FadD33	<i>Fatty acyl-CoA synthetase</i> (=Yağ açıl-KoA sentetaz)

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (=Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
IFN-gamma	İnterferon-gamma
IL	İnterlökin
iM	İndüklenebilir makrolid direnci
LAM	Lipoarabinomannan
LM	Lipomannan
MAK	<i>Mycobacterium avium</i> kompleks
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass Spectrometry</i> (=Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi)
mg	Miligram
MGIT	<i>Mycobacterium Growth Indicator Tube</i> (=Mikobakteri Üreme Belirleme Tüpü)
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MTK	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks
NF- κ β	Nükleer faktör kappa-beta
NK	<i>Natural killer</i> (=Doğal öldürücü hücre)
OD	Optik dansite
OADC	Oleik asit, albümin, dekstroz, katalaz
PBS	Fosfat tamponlu salin
PDIM	<i>Phthiocerol dimycocerosates</i> (=Fitioserol dimikoserolat)
PIM	Fosfatidil-miyo-inozitol-mannozydler
PGL	Fenolik glikolipitler
PPD	Pürifiye protein derivesi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
TDM	Tüberküloz dışı mikobakteri
TNF	Tümör nekroz faktörü

TLR	<i>Toll-like receptors</i> (=Toll benzeri reseptörler)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

TABLULAR

Tablo 2. 1. Runyon Sınıflaması	6
Tablo 3. 1. <i>erm</i> (39) geninin PZR'de çoğaltılması için kullanılan ileri (<i>forward=F</i>) ve ters (<i>reverse=R</i>) primer dizileri	32
Tablo 3. 2. PZR bileşenleri	32
Tablo 3. 3. Dizileme reaksiyonu bileşenleri	34
Tablo 3. 4. Sanger dizileme aşamasında yapılan PZR döngü koşulları	35
Tablo 4. 1. Klaritromisin MİK sınır değerleri ($\mu\text{g/ml}$) [153]	38
Tablo 4. 2. MİK değerleri ve indüklenebilir makrolid (iM) direnci durumu	39
Tablo 4. 3. <i>M. fortuitum</i> izolatlarının kümülatif duyarlılık oranları	40
Tablo 4. 4. <i>M. fortuitum</i> izolatlarının MİK50 ve MİK90 değerleri ($\mu\text{g/ml}$)	40
Tablo 4. 5. Biyofilm yorumlanmasında kullanılan formül [160]	41
Tablo 4. 6. Biyofilm çalışmasında elde edilen optik dansite (OD) değerleri ve yorumlanması	42
Tablo 4. 7. İzolatların klaritromisin duyarlılık sonuçları ve saptanan nükleotit ve amino asit değişiklikleri	46
Tablo 4. 8. iM(+) izolatlarda saptanan nükleotit ve amino asit değişimleri	47
Tablo 4. 9. iM(-) izolatlarda saptanan nükleotit ve amino asit değişimi	48
Tablo 4. 10. Parametrelerin Dağılımları	48
Tablo 4. 11. Post-hoc ikili karşılaştırmalar	49
Tablo 4. 12. OD ve MİK Karşılaştırmaları	50
Tablo 4. 13. Farklı günlerde MİK sonuçları ile OD yorumlarının karşılaştırılması ..	51
Tablo 4. 14. Farklı zamanlardaki MİK sonuçlarının OD değerleriyle karşılaştırılması	52

ŞEKİLLER

Şekil 2. 1. Mikobakteriyel hücre duvarı [52]	9
Şekil 3. 1. Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen <i>M. fortuitum</i> kolonilerinin görünümü	27
Şekil 3. 2. Kristal viyole eklenmiş biyofilm mikroplağının görünümü	30
Şekil 4. 1. 1-5: 2-4-5-13-40 numaralı izolatların PZR ürünleri; 6: pozitif kontrol; ..	43
Şekil 4. 2. İzolat 2, 258. pozisyonda tek nükleotit değişimi (C→T) (Görüntü <i>FinchTv</i> versiyon 1.4 yazılım programından alınmıştır.)	44
Şekil 4. 3. İzolat 2 ve izolat 16, 120. kodon prolin→ serin amino asit değişikliği (Görüntü, <i>MEGA</i> versiyon 11 yazılım programından alınmıştır.)	45
Şekil 4. 4. Farklı zamanlarda elde edilen MİK değerlerinin ortalaması (72. saat, 96. saat, 120. saat, 14. gün)	50

1. GİRİŞ

Mycobacterium cinsi içerisinde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK), *Mycobacterium leprae* ve tüberküloz dışı mikobakteriler (=TDM, atipik mikobakteriler) yer alır. Tüberküloz, en sık akciğerleri etkilemekle birlikte, akciğer dışı organları da etkileyen önemli, bulaşıcı bakteriyel bir hastalıktır. Her yıl yaklaşık olarak 10 milyon yeni olgunun görüldüğü ve 1,3 milyon kişinin ölümüne yol açan bu hastalık, etkili tedavi edilmediği takdirde ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilmektedir [1, 2]. Dünya nüfusunun yaklaşık olarak dörtte birinin tüberküloz basiliyle enfekte olduğu düşünülmektedir [3, 4]. Tüberküloz basili damlacık çekirdeği yoluyla inhale edilip akciğere ulaştıktan sonra enfekte bireylerin büyük çoğunluğunda immün sistem aracılığıyla basilin çoğalması baskılanır ve aktif hastalık gelişimi önlenir. Mikobakteri türleri içerisinde en ciddi enfeksiyonlara yol açan iki tür *M. tuberculosis* ve *M. leprae*'dir. İnsanlardan evcil ve vahşi hayvanlara kadar çok sayıda canlı türünde enfeksiyona yol açabilen mikobakteriler insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır [5].

TDM içerisinde 200'den fazla sayıda tür tanımlanmış olup en sık karşılaşılan türler *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium avium* kompleks (MAK), *Mycobacterium abscessus* kompleks ve *Mycobacterium fortuitum* kompleks'tir [6, 7]. TDM türleri doğada yaygın olarak bulunurlar ve aerosol, su, toprak ve gıda gibi çeşitli çevresel kaynaklardan basilin alınmasıyla insan vücudunda enfeksiyona yol açmaktadırlar [8]. TDM enfeksiyonları daha çok immünespresif bireylerde görülmekte olup daha az sıklıkta immün sistemi sağlıklı olan bireylerde de görülebilmektedir [9].

Mycobacterium fortuitum, TDM türleri içerisinde hızlı üreyen bir mikobakteridir. Bu bakteri türünün özellikle immünespresif bireylerde ciddi nazokomiyal enfeksiyonlara neden olabildiği bildirilmiştir. Hastane cihazları, ameliyathanede kullanılan aletler, implantlar ve su sistemlerinde kolonize olup biyofilm oluşturan türler, altta yatan bir immün bozukluğa bağlı olarak fırsatçı enfeksiyonlar geliştirebilmektedir. Yara yeri enfeksiyonundan ölümcül sepsis ve hastane salgınlarına kadar ilerleyebilen enfeksiyonların etkin tedavi edilerek kontrol altına alınması büyük önem taşımaktadır [7].

Klaritromisin, makrolid grubu bir antibiyotik olup *M. fortuitum* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Esas yapısı mukopolisakkarid olan biyofilmler içerisinde özelleşmiş hücre popülasyonları antimikrobiyallere karşı yüksek minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve/veya ilaç direncine yol açarak tedavi kontrolünü zorlaştırmaktadır. TDM'lerde antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması, bu enfeksiyonların tedavi yönetimini şekillendirmektedir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi önerilmektedir [10, 11]. Biyofilm varlığında yüksek klaritromisin MİK'leri görülmektedir. Buna ek olarak, indüklenebilir direnç de tedaviyi zorlaştırmaktadır. *erm* (39) geninde mutasyon varlığında indüklenen makrolid direnci görülebilmektedir. Bu nedenle, *M. fortuitum* türleri in vitro olarak klaritromisine duyarlı bulunsa bile tedavi altında direnç geliştirebilir [12].

Bu tez çalışmasında standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 40 adet *M. fortuitum* izolatının klaritromisin duyarlılığı belirlenmiştir. Tüm izolatlara *M. fortuitum erm* (39) genindeki mutasyon varlığının saptanması açısından Sanger DNA dizi analizi uygulanmıştır. Ayrıca kristal viyole kullanılarak mikropakta biyofilm varlığı saptanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikobakterilerin Tarihçesi

Tüberkülozun tarihçesi yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. *M. tuberculosis*, insanda hastalık oluşturan bakteriler içerisinde ilk tanımlanan mikroorganizmalardan biri olup üç milyon yıllık geçmişi olduğu düşünülmektedir. Hippocrates tarafından “erime” olarak tanımlanan bu hastalık Avrupa’da Orta Çağ ve sonrasında “*King’s evil*” olarak anılmıştır. Türkçe’de ise tüberküloz için “verem”, “ince hastalık” ifadeleri kullanılmıştır [13-15]. 18. yüzyılda ve 19. yüzyılın erken dönemlerinde tüberküloz, erişkin ölümlerinin en önde gelen sebebi olmuştur. Bu dönemde, bu hastalığın vücuttaki yıkıcı etkilerinden dolayı “tükenme” hastalığı olarak anılmıştır. M.Ö. 3000’de Nil Nehri çevresinde Dra Abu-El Naga kasabasında yaşamakta olan genç bir kızın kanlı balgam nedeniyle ölmesinden sonra tüberkülozla ilgili ilk bilgiler elde edilmeye başlanmıştır. M.Ö. 1000 yılında ise rahip Nesperehan’ın mumyasında günümüzde Pott hastalığı olarak bilinen vertebra tüberkülozu saptanmıştır [16]. Tüberküloz terimi ilk kez 1834’te Johann Schoenlein tarafından kullanılmış olup Eski Yunan’da “fitizis” olarak bahsedilmiştir. Yunanlı, Çinli ve Mısırlılara ait eski tıbbi kaynaklarda bahsedilen bu hastalığın *M. tuberculosis* basili tarafından meydana geldiği ilk kez 1882 yılında Robert Koch tarafından keşfedilmiştir. Koch tarafından tüberküloz basilinin izole edilmesinden yaklaşık 40 yıl sonra Albert Calmette ve Camille Guerin canlı *Mycobacterium bovis* suşusunu kullanarak 20 yıllık bir çalışma sonucunda ilk tüberküloz aşısını bulmuşlar ve ardından bu aşı öncelikle Fransa’daki çocuklar olmak üzere tüm dünyaya yayılarak uygulanmıştır [17, 18].

1945 yılında streptomisin ilk tüberküloz ilacı olarak tarihe geçmiştir. 1952’de izoniazid, 1960’lı yıllarda etambutol ve 1970’li yıllarda rifampisin tüberküloza karşı etkinliği gösterilmiştir. Daha sonra hücre içi dormant basilleri hedef alan pirazinamidin tedavi rejimine eklenmesiyle tüberküloz tedavisi daha etkili hale gelmiştir.

1930’lu yıllarda TDM’lerin insanlarda hastalık oluşturabileceği anlaşılmış ve 1943’te MAK’a bağlı gelişen akciğer hastalığı tanımlanmıştır. Özellikle HIV ile enfekte immünespresif bireylerin sayısı arttıkça MAK enfeksiyonlarının da artış

gösterdiği saptanmıştır. Günümüze kadar çok sayıda TDM türü keşfedilmiş olup bu türlere bağlı gelişen enfeksiyonlar önemini korumaktadır [19, 20].

M. fortuitum, ilk kez 1905 yılında Kuster tarafından, kurbağada izole edilmiş olup “soğuk kanlıdaki tüberküloz basili” olarak nitelendirilmiştir. Bergey ve arkadaşları tarafından 1923’te bu basile *Mycobacterium ranae* ismi verilmiştir. 1938’de da Costa Cruz, bir abse örneğinden *M. ranae*’ye benzeyen bir basil türü izole etmiş ve bu basili *M. fortuitum* olarak isimlendirmiştir. 1950-1962 yılları arasında *Mycobacterium giae*, *Mycobacterium minetti*, *Mycobacterium peregrinum* isimleriyle anılan türlerin sonradan *M. ranae* türüne ait olduğu bulunmuştur. 1972’de Runyon, *M. ranae* isminin kullanılmamasını; bunun yerine *M. fortuitum*’un kullanılmasını önermiştir [21-23].

2.2. Mikobakterilerin Sınıflaması, Genel Özellikleri

Mikobakteriler, 0.2-0.6 µm x 1.0-10 µm boyutlarında çomak şeklinde bakterilerdir. Aside dirençli basil (ARB) olarak tanımlanan mikobakteriler, Gram pozitif, sporsuz, katalaz pozitif, hareketsiz, asit ve alkaliye dirençlidirler [24]. *Mycobacterium*, Yunanca’da, üreme özelliklerinin küflere benzemesinden dolayı fungus anlamına gelen “myces” ve küçük çubuk anlamına gelen “bakterion” kelimelerinden türetilmiştir [25]. Mikobakteriler taksonomik olarak Actinomycetia sınıfının *Mycobacteriaceae* ailesindeki *Mycobacterium* cinsi içinde yer almaktadır.

2018 yılında, tüm genom analizi kullanılarak *Mycobacterium* cinsi yerine beş cins tanımlanmıştır: Bu cinsler *Mycolicibacterium*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus*, *Mycobacteroides* ve *Mycobacterium* olarak tanımlanmıştır [26]. Bu gruplama amino asit benzerlikleri ve korunmuş protein bölgeleri saptanarak yapılmıştır. Klinik açıdan bu grupların her birine yönelik ayrı bir tedavi şeklinin bulunmaması sebebiyle bu grupların birbirinden ayırt edilmesi henüz tam anlamıyla yerleşmemiştir [27]. Mikobakterilerin belli bir gruba dahil edilmesinde, 16SrRNA benzerliği (%94-%95) ve amino asit benzerliği (% ≥65) kullanılmakla beraber günümüzde taksonomik çalışmalarda genom temelli yöntemler dahil edilerek taksonomik sınıflamalar genişletilmiştir [27, 28].

Mikobakteriler, MTK, *M. leprae* ve TDM olarak incelenirler. MTK içerisinde *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* Bacillus Calmette–Guerin (BCG), *Mycobacterium orygis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium suricattae* yer alır [29, 30].

TDM'ler, MTK ve *M. leprae* dışındaki mikobakteri türlerini tanımlar [31]. TDM'ler, 1959'da Runyon tarafından pigment oluşturma özellikleri, koloni morfolojileri ve üreme hızları dikkate alınarak dört grupta incelenmiştir. Bu grupta yer alan türler Tablo 2.1.'de verilmiştir [32].

Tablo 2. 1. Runyon Sınıflaması

Özellik	Pigment	Koloni Morfolojisi	Üreme Hızı	Önemli Türler
Runyon I Fotokromojen	Işıktaki pigmentli	Çoğunlukla R	Yavaş (>7 gün)	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>
Runyon II Skotokromojen	Karanlıkta ve ışıkta pigmentli	S/R	Yavaş (>7 gün)	<i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i>
Runyon III Kromojen olmayan	Karanlıkta ve ışıkta pigmentlessiz	S/R	Yavaş (>7 gün)	MAK- <i>M. avium-intracellulare</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i>
Runyon IV Hızlı üreyenler	Pigmentli veya pigmentlessiz	Çoğunlukla S	Hızlı (<7 gün)	<i>M. fortuitum</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i>

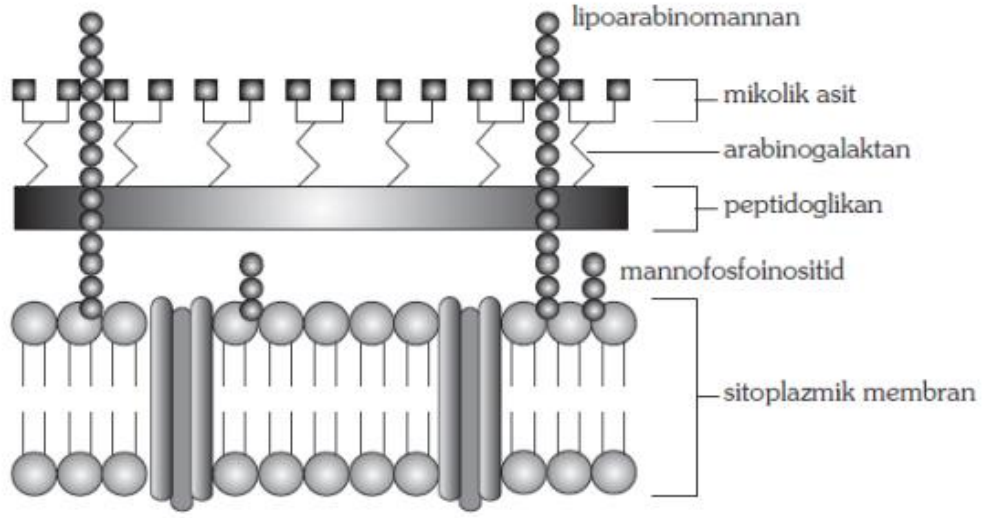
Günümüzde moleküler tekniklerin ilerlemesi ile birlikte 200'ün üzerinde TDM türü tanımlanmıştır [33]. Önemli bir artış gösteren TDM enfeksiyonları, genellikle akciğerde fırsatçı olarak duyarlı bir konağı enfekte eder. TDM enfeksiyonları hem immün sağlıklı hem de immünesupresif bireylerde ciddi morbidite ve mortalitelere yol açmaktadır. Kronik obstruktif akciğer hastalığı, kistik fibrozis ve bronşektazili bireyler TDM enfeksiyonlarına yatkındır [12]. Bu mikroorganizmalar çevrede su, hava, toprak, soğutma sistemleri, duş başlıkları biyofilm ve gıdalara kadar birçok yerden izole edilebilir [31, 34, 35].

Mikobakteri türlerinin tanımlanmasında 16SrRNA dizi analizi yer alır. Üreme özelliklerine göre “hızlı üreyenler ve “yavaş üreyenler” şeklinde gruplandırılabilen TDM’ler içerisinde dünya genelinde insanda en sık hastalık oluşturan türün “yavaş üreyenler” grubunda yer alan MAK olduğu bilinmektedir [35]. İkinci en sık TDM türünün ise “hızlı üreyenler” grubunda yer alan *M. abscessus* kompleks olduğu bildirilmiştir. *M. fortuitum*, *M. abscessus* ve *M. chelonae* travma sonrası ve nazokomiyal enfeksiyonlarda en sık izole edilen hızlı üreyen TDM türleridir. Günümüzde, rutin laboratuvarlarda da “hızlı üreyen” ve “yavaş üreyen” olarak iki grupta incelenmekte ve duyarlılık testleri bu ayrıma göre yapılmaktadır [36].

Mikobakteriler zorunlu aerop olduklarından dolayı üremeleri oksijene bağımlıdır. İyi oksijenlenen organlara yerleşme eğilimi göstermekte olup bunların en başında akciğer gelmektedir. Apikal akciğerin daha iyi havalanmasına bağlı olarak oksijen basıncı daha yüksektir ve tüberküloz basili en sık bu bölgeye yerleşir. Mikobakteri türleri genellikle 35°C-37°C’de üremekle beraber üreme sıcaklığı 24°C - 42°C arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Mikobakterilerin üretilmesi için özel besiyerlerine gereksinim duyulmaktadır. Temel karbon kaynağı gliserol, nitrojen kaynağı asparajin amino asidi olup lipid ihtiyacı için yumurtaya ihtiyaç vardır. Malaşit yeşili, normal flora bakterilerini baskımlarken mikobakteriler üzerinde inhibisyon oluşturmamaktadır; bu nedenle mikobakterileri üretmek amacıyla kullanılan çeşitli besiyerlerinin içerisine malaşit yeşili eklenmektedir [32, 37].

Mikobakteriler, diğer bakterilerden farklı bir hücre duvar yapısına sahiptir. Lipitten zengin kalın hücre duvarı, lipofilik özelliktedir. Hücre duvar yapılarının farklılık göstermesine bağlı olarak gram boyasıyla boyanmazlar ve alkol ve asit/alkaliye direnç gösterirler. Ayrıca hücre duvarının çok sayıda antibiyotiğin hücre içine girişini engellemesine bağlı olarak ilaç direnci görülmektedir. Mikobakteriyel hücre duvarının kompleks yapısının büyük bir bölümü lipid bileşenlerden meydana gelmektedir [38, 39]. Mikobakterilerin hücresel yapı ve bileşenleri diğer bakterilerle benzerlik gösterirken hücre duvarı yapısı farklılık göstermektedir. Mikobakterilerin hücre zarının dış katmanında kalın bir peptidoglikan tabaka yer almaktadır. Peptidoglikan tabaka hücre duvarının sağlamlığını ve hücrenin şeklinin korunmasına destek olur [32, 37, 40]. Peptidoglikan tabaka fosfodiester bağlarıyla polisakkarit

yapıdaki arabinoz ve galaktoz birimlerinden meydana gelen arabinogalaktana bağlanır. Arabinogalaktan, mikobakterilerin makrofaj içerisinde canlılığının sürdürülmesine katkıda bulunurken ayrıca hücre geçirgenliğinin önüne geçmektedir [41]. Arabinogalaktan yapısında yer alan D-arabinoz kalıntıları uzun zincirli satüre yağ asitlerinden oluşan mikolik asitlerle köprü oluşturur. İki zincirli alifatik yağ asitlerinden oluşan mikolik asit tabakasında uzun zincir 50-56 karbon, kısa zincir ise 22-26 karbon birimine sahiptir. Mikolik asitler metil, metoksi ya da siklopropan halkası gibi çeşitli yan gruplar içerebilmektedir [42, 43]. Mikolik asit tabakasının mikobakteri türlerine özgül yapıda olduğu bilinmektedir [44]. Hücre duvarındaki lipit miktarının %11'ini oluşturan kalın yapıdaki mikolik asit tabakası mikobakterilere farklı karakteristik özellikler kazandırmaktadır. Bu özellikler içerisinde dış ortam koşullarına ve antibiyotiklere direnç, aside dirençli olmaları ve yavaş üreme paternine sahip olmaları yer almaktadır [45]. Mikolik asitler çeşitli mikobakteri türlerinde trehaloz ile bağ oluşturarak kord faktörü meydana getirir. Glikolipit yapıdaki kord faktör, lökositlerin göçünü engelleyerek immün yanıtın baskılanmasında rol alır [46, 47]. Mikobakteri hücre duvarının %60'ı lipitlerden oluşmaktadır ve mikolik asit dışında mikoserozik asit ve tüberkülostearik asit gibi uzun zincirli yağ asit yapıları yer almaktadır. Mikobakteriyel hücre duvarının en dış tabakasında genellikle ağ yapısı oluşturan trehaloz dimikolat ve sülfolipitlerden oluşan uzun zincirli yağ asitleri, kompleks serbest lipitler, lipopeptitler, peptidoglikolipitler ve lipoarabinomannanın (LAM) mannan kısmı yer almaktadır [37, 40, 48]. LAM arabinoz ve mannandan oluşan bir dallı polisakkarittir ve hücre duvarını boydan boya katetmektedir. Mikobakteriler için önemli bir virülans faktörü olan LAM'ın immün düzenleyici ve anti-inflamatuvar etkileri bulunmaktadır. İmmün sistem üzerindeki etkilerine bağlı olarak makrofajlar üzerinde inhibe edici etkileri bilinmektedir [49]. Mikobakterilerin hücre duvarı kalın yapısından dolayı diğer bakterilere göre hidrofilik molekülleri 100-1000 kat daha az geçirir. Porinler küçük ve hidrofilik yapıdaki maddelerin geçişini kolaylaştırma fonksiyonuna sahiptirler [50, 51]. Mikobakteriyel hücre duvarının görünümü Şekil 2.1.'dedir.



Şekil 2. 1. Mikobakteriyel hücre duvarı [52]

2.3. Mikobakterilerin Virülans Faktörleri

Mikobakteriyel virülans faktörlerini, mikobakteriyel lipitler, sekresyon faktörleri, hücre yüzey bileşenleri, enzimler, transkripsiyonel düzenleyici faktörler şeklinde gruplamak mümkündür [53]. Başka bir sınıflamada ise mikobakteriyel virülans faktörleri protein ve protein dışı moleküller şeklinde gruplandırılmıştır [54]. Mikobakteriyel virülans faktörleri değerlendirilirken immün yanıtta kaçış, akciğer hasarı oluşturma ve bulaştırıcılık yeteneği gibi faktörler göz önüne alınmaktadır [55]. Mikobakterilerin 90'dan fazla virülans faktörü tanımlanmıştır. Isı şok proteinleri, pürifiye protein derivesi (PPD), kord faktör (trehalose-6,6'- dimikolat), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz peroksidaz, erken salınan antijen 6 (*early secreted antigen-6=ESAT-6*), mum D ("wax D"), antijen 60, antijen 85, sülfolipidler, lipoarabinomannan (LAM), lipomannan (LM) bunlardan bazılarıdır [52, 53].

Fosfatidil-miyo-inozitol-mannozidler: LM ve LAM'ın öncüsü olan PIM, mikobakteri hücre zarfında en fazla bulunan lipittir. PIM'e bağlı mannoz üniteleri türden türe farklılık göstermektedir. Virülans yüksek türlerin beş ya da altı mannoz üniteleri vardır ve mannoz repetörüne bağlanarak makrafaj tutulumunu sağlarlar. Mannoz reseptörlerinin az bir kısmı ise dendritik hücrelerle etkileşime girerler [56].

PIM, CD4+ T hücre, TNF alfa ve IL-12'nin salgılanmasını inhibe ederek konak immün yanıtını baskılamaktadır [57].

Lipoarabinomannan (LAM): LM'nin çoklu arabinoz ünitelerine bağlanmasıyla oluşan glikolipittir. Mannoza bağlı LM kazandığında ManLAM, arabino-furazonil bağlı LM kazandığında AraLAM, fosfatidil-inozitol bağlı LM kazandığında ise PILAM adını alır. LM, LAM, AraLAM, PILAM molekülleri antijen sunan hücrelerin çeşitli yüzey reseptörlerine bağlanarak mikobakterilerin konak hücre içerisine girmesini sağlar [53, 56].

Lipomannan (LM): Çoklu glikozil grubuna sahip bir glikolipittir. LAM ve LM mikobakteri hücre duvarında birlikte yer alır. LM'nin kazanılmış bağışıklıkta önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. *MyD88* yolu üzerinden TLR 2-4 aracılı makrofaj aktivasyonunu sağladığı bulunmuştur. LM'nin iki açilli formu makrofaj içi nitrik oksit ve sitokin üretimini baskılar.

Fitioserol dimikoserolat (*Phthiocerol dimycocerosates*=PDIM) ve fenolik glikolipitler (PGL): Mikobakterilerin majör virülans faktörü olan PDIM ve PGL, hücre duvarına bağlı bir grup lipit moleküllüdür. Bakteriyel duplikasyonda görev alan bu moleküllerin farklı fonksiyonları keşfedilmiştir. PDIM, TLR aracılı patojen tanıma sistemini etkileyerek immün yanıtın aktivasyonunu geciktirir. PDIM ayrıca fagozom asidifikasyonunun engellenmesi, TNF regülasyonu, deterjanlara direnç ve hücre duvarının sağlamlığının korunmasına yardımcı olur [53, 58]. PGL, genellikle hızlı üreyen mikobakteriler tarafından oluşturulur. *Phs15/1* genindeki mutasyona bağlı olarak MTK ve H37Rv tarafından üretilmezler. *M. leprae*'da bulunan immünojenik bir glikolipit olan PGL1, lepra hastalığındaki demiyelinasyon ve akson hasarı ile ilişkilendirilmiştir [59].

Yağ açıl-KoA sentetaz (*Fatty acyl-CoA synthetase*=FadD33): Açıl-KoA sentaz olan bu faktör, virülan H37Rv suşunda, avirülan H37Ra suşuna göre daha fazla orandadır. FadD33 proteininin dokuya özgül olarak bakteri replikasyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. FadD33 yokluğunda karaciğerdeki replikasyonu azalma gösterirken akciğer ve dalakta replikasyonda değişiklik görülmemiştir [60].

Katalaz, alkil hidroperoksidaz: Mikobakteriler, reaktif oksijen radikallerinin üretimini baskılayarak oksidatif hasarın önüne geçmek amacıyla çeşitli adaptif yanıtlar

geliştirmişlerdir. Bunlardan ikisi katalaz-peroksidazı kodlayan *katG* ve hidroperoksit redüktazı kodlayan *ahpC* genleridir. Bu genlerin ürünleri anti-oksidatif niteliktedir. *KatG* ayrıca izoniazidin aktivasyonunda rol alarak mikobakterilerin bu antibiyotiğe karşı duyarlılık profilini belirler [61].

Bu virülans faktörlerine ek olarak koloni morfolojisi de virülansı etkilemektedir. Yüzeyi düzgün, yassı, saydam, koloni oluşturan mikobakteri türlerinin yüzeyi düzgün, kubbe şeklinde ve opak koloni oluşturan türlere göre daha virülan olduğu öne sürülmektedir [62]. Benzer şekilde, yüzeyi düzgün, yassı, saydam, koloni oluşturan *M. fortuitum* suşlarının daha düşük miktarda nitrik oksit üretimine yol açtığı ve dolayısıyla daha virülan olduğu bildirilmiştir [63].

2.4. Mikobakterilerin İmmünpatogenezi

Hava yolundan alveoler boşluklara ulaşan basiller ilk önce doğal bağışıklık yanıtı ile karşılaşır. Alveoler makrofajlar, dendritik hücreler, tarafından fagosite edilir [41, 64, 65]. Mikobakterileri taşıyan bu bağışıklık hücreleri erken granülom denilen yapıları oluşturur. Granülom içerisinde çoğalan mikobakteriler çeşitli mekanizmalarla fagolizozom yanıtını baskılar [66]. Granülom oluşumu esas olarak MTK'da görülürken bazı TDM türlerinde de raporlanmıştır. TDM içinde, özellikle *M. avium* ve *M. abscessus* enfeksiyonlarına bağlı granülom oluşumu bildirilmiştir [67].

TDM türleri içerisinde *M. fortuitum*, *M. abscessus* ve *M. avium*'un, kaspaz-8 aracılığıyla fagozom içerisinde canlı kalabildiği bildirilmiştir [68]. *M. abscessus* üzerinde yapılan çalışmalarda, fagozomdan kaçış mekanizmasının temelde fagozom içerisindeki hücre popülasyonunu artırıp fagozom membranının hasarı sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir. Fagozom membranının hasar görmesi sonucu ortaya çıkan interferon-gamma (IFN-gamma) yanıtı ise TDM türlerinin hücreden hücreye yayılmasını kolaylaştırmaktadır [69]. TDM türleri için de MTK'da olduğu gibi yardımcı T hücre 1 (T helper 1=Th1) yanıtının konak immün cevabında anahtar rolü üstlendiği bilinmektedir. Makrofajlar içerisine alınan mikobakteriler, *toll* benzeri reseptörler (*toll-like receptors*=TLR) aracılığıyla nükleer faktör kappabeta (NF- κ B) yanıtını uyarır [70, 71]. Bu yanıtta özellikle mikobakteriyel lipoproteinleri tanıyan

TLR-1 ve TLR-2 cevabı öne çıkmaktadır. Makrofajlar tarafından uyarılan interlökin (IL)-12 cevabı, doğal öldürücü hücre (*natural killer*=NK) ve T hücreleri uyararak IFN-gamma cevabını ortaya çıkarmaktadır. Makrofajlar tarafından üretilen tümör nekroz faktör (TNF)-alfa da TDM türlerinin üremesini baskılamaktadır. Ayrıca, Th17 tarafından üretilen IL-17'nin, IFN-gamma yanıtını uyardığı gösterilmiştir [72].

2.5. TDM Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Yapılan çalışmalarda özellikle son 20 yılda TDM enfeksiyonlarının artış gösterdiği dikkati çekmektedir [73]. Bu artışın olası nedenleri arasında kronik akciğer hastalıklarının daha sık görülmesi, çevre ve iklim değişikliği, beklenen yaşam süresinin artışına bağlı konak immünesindeki değişiklikler, immünsupresif olguların artış göstermesi, virülans artışı, genetik mutasyonlar, TDM ile ilgili araştırmaların ve yayınların artması, sağlık çalışanlarının TDM konusundaki farkındalığının artması, TDM tanısına yardımcı olan radyolojik görüntüleme ve laboratuvar olanaklarının ilerlemesi ve tüberküloz insidansının azalması ve dolayısıyla mikobakterilere karşı gelişen bağışıklığının azalması sayılabilir. Veri kayıt sistemi bulunmayan ya da yeterli düzeyde çalışmayan ülkelerde TDM enfeksiyonlarının epidemiyolojik verilerine ulaşmak zordur [74]. TDM türleri arasında dünya genelinde en sık saptanan tür MAK olsa da coğrafik ve sosyodemografik özelliklere göre MAK dışındaki TDM türleri öne çıkabilmektedir [75]. TDM enfeksiyonlarının insandan insana geçişi konusu tartışmalıdır. Genel olarak TDM türlerinin insandan insan bulaşmadığı kabul edilse de kistik fibrozisli bireylerde *M. abscessus*'a bağlı salgınlara bildirilmesi insandan insana bulaşabileceğini düşündürmektedir [13, 76]. ABD verileri incelendiğinde TDM enfeksiyonlarının insidansı 1980'lerde 2.4/100.000 kişi iken 2013 yılında bu oran 15.4/100.000'e yükselmiştir [77]. Birleşik Krallık'ta yapılan bir çalışmada, TDM enfeksiyonlarının insidansının 2007 yılından 2012'ye 4/100.000'den 6.1/100.000'e artış gösterdiği saptanmıştır [78]. Kanada'da ise TDM enfeksiyonlarının insidansı 1998'de 4.65/100.000 kişiden 2010'da 9.08/100.000 kişiye yükselmiştir. Günümüzde Kanada ve ABD'de TDM enfeksiyonları tüberkülozdan daha sık görülmekte olup, TDM türlerinin laboratuvar ortamında izole edilme oranlarının 1997'den 2003'e kadar

%8.4 artış gösterdiği ortaya konmuştur [31]. Danimarka, Almanya ve Birleşik Krallık'ta da benzer şekilde TDM türlerinin laboratuvar izolasyon oranlarında artış olduğu bildirilmiştir [79-81]. Güney Kore'de 2002-2008 arasında TDM deniyle ortaya çıkan akciğer enfeksiyonlarının %62 artış gösterdiği ve en sık görülen türün *M. abscessus* kompleks olduğu bildirilmiştir. *M. abscessus* kompleks özellikle Tayvan, Japonya ve Kore gibi Doğu Asya ülkelerinde sık görülmektedir [31, 82].

Türkiye'de TDM enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ile ilgili veriler sınırlıdır. İstanbul'da Köksalan ve arkadaşları tarafından TDM enfeksiyonu oranı %0.62 olarak bildirilmiştir [83].

2.6. TDM Enfeksiyonlarının Klinik Patolojisi

TDM türleri, genellikle akciğer enfeksiyonları ile karşımıza çıkarken nadiren akciğer dışı hastalık da geliştirebilmektedirler [12]. TDM enfeksiyonları klinik dört grupta incelenir: kronik pulmoner akciğer hastalık, lenfadenopati, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, yaygın hastalık olarak özetlenebilir [84]. Akciğer tutulumu, nodüler broşektazi, hipersensitivite pnömonisi ve fibro-kaviter hastalık olarak üç grupta incelenebilir [31]. Klinik belirtileri belirgin olmayan enfeksiyonlar tanı sürecini zorlaştırmaktadır ve dolayısıyla hastaların tedavi sürecini geciktirmektedir [12].

HIV negatif bireylerde TDM'ye bağlı gelişen akciğer hastalığının kliniğini, tüberküloz hastalığından ayırmak zor olabilir. Parankimal opasite, kavite oluşumu ve plevral kalınlaşma gibi tablolar karşımıza çıkar [85]. Klinik belirtiler arasında öksürük, ateş, kilo kaybı, güçsüzlük şeklinde özgül olmayan belirtiler yer alır [86]. HIV pozitif hastalarda ise klinik seyir çok daha hızlıdır ve radyolojik görüntüleme sonuçları genellikle normaldir. Radyolojik görüntülemelerde bazen hiler ya da mediastinel lenfadenopati bulguları görülebilir. HIV pozitif hastaların CD4+ lenfosit sayıları genellikle 100/mm³'ün altındadır [87].

Çoğunlukla TDM'ye bağlı gelişen akciğer enfeksiyonu, akciğer patolojisi bulunan yaşlı erkek bireylerde, kronik pnömoni şeklinde kendini gösterir. Etken en sık MAK içinde yer alan *M. avium* ve *M. intracellulare*'dir [85]. Akciğer TDM enfeksiyonunun diğer bir klinik şekli de "*Lady Windermere*" sendromudur. Bu

sendromda sağ akciğer orta lob ya da lingular loba sınırlı MAK enfeksiyonu görölmekte olup klinik olarak bronşektazi semptomlarıdır (balgam çıkarma, yorgunluk, öksürük) [88]. Bu sendrom, genellikle göğüs kafesi anomalisi bulunan ve altta yatan herhangi bir akciğer patolojisi bulunmayan yaşlı kadınlarda ortaya çıkar [89].

Bazı klinik tablolar, TDM enfeksiyonlarına zemin hazırlar. Örneğin, kistik fibrozisli bireylerde *M. abscessus* ve MAK enfeksiyonları ön plana çıkmaktadır [90]. Lipoid pnömonisi olan bireylerde ise hızlı üreyen TDM'ler daha sık izole edilmektedir [91]. Hipersensitivite pnömonisi olan olgularda ise *M. immunogenicum* izolasyonu sıktır [92]. Akciğer örneklerinden TDM türü izole edildiğinde çoğu zaman kontaminasyon-kolonizasyon ayrımı zordur. İzole edilen mikobakteri çevresel kontaminant olabilir ya da hastanın kliniği ile ilişkisiz solunum yollarında kolonize şekilde olabilir. Bu durumun çözümlenmesi çoğu zaman klinisyen ve mikrobiyolog arasında iş birliği gerektirir [93].

Akciğer dışı TDM enfeksiyonları genellikle çocuklarda servikal lenfadenit ve yumuşak doku enfeksiyonları, immünsupresif bireylerde ise sistemik hastalık şeklinde izlenir. TDM enfeksiyonlarının kliniği çok geniş bir spektrumda ele alınabilir [35, 94]. Özellikle küçük bebeklerde TDM'lerin tek taraflı servikal lenfadenit yapabildiği gösterilmiştir. Boyunda lenfadenopati ve fistül oluşumu görölebilir. Lenfadenit ile *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. malmoense*, *M. lentiflavum* türleri çoğunlukla ilişkilendirilmiştir [85, 95]. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları granülomlarla karakterize olup selülit ve ülsere ilerleyebilir. Akvaryum ve balıkçılıkla uğraşan bireylerde ön kol ya da elde nodüler ya da ülsere lezyonlar göröldüğünde etken olarak *Mycobacterium marinum* düşünölmelidir. Bu türün optimal üreme sıcaklığı 32°C olduğundan rutin laboratuvarlarda sadece 37°C'de inkübasyon yapıldığında izole edilme şansı düşmektedir [96]. *Mycobacterium ulcerans*, ağrısız, büyük, nekrotizan ülserlerle karakterize geniş skar bırakan lezyonlar oluşturur. Bu lezyonlar, "Buruli ülseri" olarak da adlandırılmaktadır [97]. *M. haemophilum*, ağrılı abselere neden olan başka bir TDM türüdür [98].

Yaygın hastalık, hemen her zaman immünsuprese (özellikle HIV pozitif bireylerde) görölmekte olup solunum sistemi ya da gastrointestinal kanalda yer alan

bir enfeksiyon odağından sistemik dolaşıma yayılım ile ortaya çıkmaktadır. Diyare, ateş, kilo kaybı, anemi gibi sistemik belirtilerle karakterize olup belirtiler hızla ilerleyebilir. Tanıda kan kültürü önemli bir yere sahiptir. İlk tanımlanan yaygın TDM enfeksiyonu MAK kaynaklı olup, özellikle CD4+ T lenfosit sayısı $100/\text{mm}^3$ 'ün altında olan HIV pozitif bireylerde ortaya çıkmaktadır [85, 87]. Antiretroviral tedavi ya da kemoproflaksi almayan HIV pozitif bireylerin MAK'a bağlı yaygın enfeksiyon riski %20-%40 arasındadır [99]. Ayrıca IFN-gamma reseptör defekti bulunan bireylerde de yaygın enfeksiyonlarla karşılaşmaktadır [100]. Hızlı üreyen TDM türlerinin özellikle hemodiyaliz hastalarında kateter ilişkili sepsise neden olabileceği gösterilmiştir [101]. Kemik iliği ve böbrek transplantasyonu geçiren hastalarda özellikle *M. haemophilum* enfeksiyonlarının sık görüldüğü rapor edilmiştir [98].

2.7. Biyofilm Genel Özellikleri

Bazı mikroorganizmalar, olumsuz yaşam koşullarına adapte olmak için biyofilm oluşturur. Bakteriyel biyofilmler, ekstraselüler polimerik matriks ("slime" faktör) aracılığıyla belli yüzeylere veya birbirlerine tutunan kompleks bakteri topluluklarıdır [102]. Biyofilmler, biyomateryaller, su boruları, tıbbi cihazlara kadar doğada çok farklı yüzeylerde bulunabilir. Biyofilm oluşumu ile ilgili ilk çalışma, 1978'de Costerton ve arkadaşları tarafından yayınlanmış olup yaklaşık on yıl sonra mikobakterilerin biyofilm oluşturmasıyla ilgili makaleler literatürde yer almıştır [103, 104]. ABD'de her yıl 17 milyon yeni biyofilm enfeksiyonunun ortaya çıktığı ve bu enfeksiyonların 555,000 kişinin ölümüne yol açtığı bildirilmiştir [105].

Biyofilm sentezlenmesinde kısa zincirli mikolik asit, GroEL şaperonu, çeşitli iyon (Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2}) ve karbon kaynaklarına ihtiyaç duyulur. Biyofilm oluşumunda temel basamaklar adezyon, kalıcı bağlanma, olgunlaşma ve parçalanmadır. Biyofilm oluşumunda ilk aşama bakteriyel adezyondur. Daha sonra bakteriyel hücre duvarından salgılanan adezin molekülleri yardımıyla bakteri çeşitli yüzeylere bağlanır. Olgunlaşma evresinde durağan bakteriler çoğalıp ekstraselüler matriksi sentezler [104]. Bakteri yoğunluğu arttığında ya da besin miktarı azaldığında biyofilm parçalanır ve bakteriler yeni yüzeylere yayılım gösterirler. Biyofilm oluşumunda

hücreler arası haberleşme “*quorum-sensing*” aracılı moleküller tarafından düzenlenmektedir. Biyofilmler, birtakım bakterilerin çeşitli antibiyotiklerden ve fagositozdan kaçmasını sağlamakta ve bu şekilde persistan enfeksiyonlara neden olmaktadır [106]. Biyofilmin esas yapısını oluşturan glikokaliks tabaka (“*slime*” faktör), biyofilm tabakasının olgun hale gelmesini, bakteri popülasyonunun olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olmasını ve antibiyotik etkisinden korunmasını sağlamaktadır [107]. Özellikle biyofilmler içerisinde persistan ve metabolik aktivitesi normal bakterilere göre daha yavaş olan özelleşmiş hücre popülasyonları oluşmaktadır ve bu hücrelerin biyofilmlerin antibiyotik direncinden sorumlu olduğu düşünülmektedir [108]. Özelleşmiş bu hücre topluluklarının serbest dolaşan planktonik hücrelere göre MİK değerlerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu dirençten, mikroorganizmanın fiziksel değişimleri ve hücresel farklılaşma sorumlu tutulmaktadır. Biyofilmlerde yer alan persistan hücreler, fenotipik faz değişimiyle replikasyon hızını azaltarak antibiyotiklerin etkinliğini azaltmaktadır. Antibiyotik direnci dışında biyofilmler içerisinde özelleşmiş bakteri gruplarının klor, glüteraldehit gibi çeşitli dezenfektanlara ve UV radyasyona dirençli oldukları saptanmıştır [109].

Biyofilm enfeksiyonlarını, cihaz ilişkili ve cihaz ilişkili olmayan olarak iki grupta ele almak mümkündür. Biyofilm, kontakt lens, protez, kateter gibi tıbbi cihazlar üzerinde oluştuğu zaman cihaz ilişkili biyofilm enfeksiyonları meydana gelir. Periodontit, osteomyelit gibi bakterinin başka bir enfeksiyon odağından hematogen yolla kemiklere ulaştığı durumlar ise cihaz ilişkili olmayan biyofilm enfeksiyonlarına örnektir [110, 111].

2.8. Mikobakterilerde Biyofilm Oluşumu

M. avium, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. abscessus* gibi farklı TDM türlerinin biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir [112]. MTK suşlarının da biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir ve biyofilm oluşumunun kazeöz nekroz ve kavite oluşumu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [104]. Mikobakteriyel biyofilmler, yapısal olarak diğer bakterilerin biyofilm özellikleriyle benzerlik göstermektedir ancak yüzeylerin yanı sıra hava-sıvı (alveoler boşluk-alveoler sıvı) ara yüzünde de biyofilm

oluşturabilmektedirler [113]. Bu farklılık, hücre duvarındaki yüksek lipit içeriği nedeniyle açıklanmaktadır. Ayrıca ekstraselüler matrikste yer alan farklı bileşenler (peptitler, glikopeptitler, lipopeptitler) de tutunma özelliklerini artırmaktadır. Mikobakterilerin, polivinil klorür, selüloz diasetat, polipropilen gibi çok çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşturabildiği bildirilmiştir. Örneğin, *M. fortuitum*'un biyofilm ilişkili protez kapak endokarditi, *M. massiliense*'nin meme implantında, *M. avium*'un duş başlıklarında biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir [113, 114]. *M. smegmatis* üzerinde yapılan bir çalışmada, glikopeptidolipitlerin biyofilm oluşumunun yüzeye bağlanma aşamasında anahtar rol üstlendiği bildirilmiştir. Biyofilmin yapısında yer alan mikolik asit yapıları, biyofilme bağlı gelişen antibiyotik ve dezenfektan direncine neden olmaktadır [104]. TDM türlerinde (Ör: *M. abscessus*, *M. fortuitum*) amikasin, klaritromisin gibi antibiyotiklere duyarlı MİK değerleri bulunsa da biyofilm varlığında antibiyotik etkinliğinde azalma ya da direnç görülebilmektedir [104, 115]. Biyofilmin yapısal özellikleri türden türe farklılık göstermektedir. Örneğin, *M. cholanæ* biyofilmi uzunlamasına büyüme gösterirken *M. fortuitum* biyofilmi, bulunduğu yüzeyin tamamını kaplayacak şekilde ince bir tabaka oluşturmaktadır [115].

2.9. *M. fortuitum*-Genel Özellikleri

M. fortuitum, TDM türleri içerisinde pigment oluşturmayan, hızlı üreyen bir bakteridir. Runyon sınıflamasında grup IV'te yer alır. *M. fortuitum* kompleksi içinde yer alan türler: *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. setense*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. porcinum*, *M. houstonense*, *M. boenickei*, *M. neworleansense*, *M. brisbanense*'dir. [11, 116]. Koloni morfolojisi, kullanılan besiyeri ve suşa göre değişkenlik göstermektedir. Düzgün yüzeyli, parlak S koloni morfolojisinden basık, kenarları tırtıklı, opak görünümde R koloni morfolojisine kadar çok farklı formlarda izlenebilir. *M. fortuitum* izolatları glikoz, fruktoz, mannoz ve trehalozu okside ederken eritritol, galaktoz, laktoz, arabinoz, ksiloz, rafinoz ve ramnozu okside etmemektedir. *M. fortuitum* izolatlarının genellikle üreyi parçaladığı bildirilirken süksinamid, izonikotinamid, salisilamid ve benamid parçalayamadığı rapor edilmiştir. Ayrıca tüm türlerin ferrik amonyum sitrat ve nitratı indirgeyebildikleri gösterilmiştir [22].

Doğada yaygın olarak bulunan *M. fortuitum*'un cerrahi aletler, implantlar ve su sistemlerinde biyofilm oluşturarak özellikle immünespresif konakta çeşitli enfeksiyonlara yol açabildiği ve salgınlara neden olabildiği bilinmektedir. Bu enfeksiyonlar içerisinde mamoplasti ve kardiyak cerrahi sonrası deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve kemik enfeksiyonları sık görülür. *M. fortuitum*'un diğer bir bulaş kaynağı ise güzellik merkezlerinde yapılan ayak banyolarıdır [117]. *M. fortuitum*'un akciğer dışı enfeksiyonlara en sık neden olan hızlı üreyen TDM türü olduğu bildirilmiştir [118]. *M. fortuitum*'un solunum yolunda izole edilmesi çoğu zaman kolonizasyon ve/veya kontaminasyon ile ilişkilendirilmektedir [118]. *M. fortuitum*, özellikle duş başlıklarına kolonize olarak hastanede yatan hastalarda akciğerde kolonizasyon ve nazokomiyal salgınlara ile ilişkilendirilmiştir [119].

2.10. TDM ve *M. fortuitum* Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

TDM enfeksiyonlarının tanısı, klinik bulgular, radyolojik değerlendirme ve mikrobiyolojik yöntemlerle konmaktadır. Enfeksiyon odağından en az iki mikrobiyolojik örnek alınmalı ve elde edilen sonuçlar mikrobiyolog ve klinisyen arasında işbirliği sağlanarak yorumlanmalıdır. Mikrobiyolojik değerlendirmede esas dikkat edilmesi gereken nokta çevrede çok yaygın olarak bulunan TDM'lerin laboratuvar örneklerinde üremesi durumunda kontaminasyon kaynaklı olup olmadığının ortaya konmasıdır. TDM kolonileri genellikle düzgün yüzeyli ve mukoid görünümündedir [120]. Amerikan Toraks Derneği önerilerine göre, pulmoner TDM enfeksiyonu tanısı koymak için en az iki ayrı balgam kültürü örneğinde aynı TDM türünün üremiş olması gerekmektedir [12]. TDM türünün bronşiyal yıkama ya da lavaj gibi alt solunum yolu örneklerinden bir kez izole edilmesi tanı için anlamlı kabul edilmektedir. Klinik şüphenin yüksek ancak laboratuvar testlerinde tanı kriterleri sağlanamıyorsa, belirli zaman aralıklarında ikiden fazla sayıda örnek alınmalıdır [121, 122]. Akciğer biyopsisi mutlak gerekli olmamakla birlikte histopatolojik değerlendirme açısından fayda sağlamaktadır [123].

Akciğer dışı TDM enfeksiyonlarında enfeksiyon bölgesine göre değişmektedir. Lenfadenit varlığında eksizyonel biyopsi ya da ince iğne aspirasyonu ile örnek

alınması önerilirken sistemik enfeksiyon varlığında kan kültürleri, deri enfeksiyonlarında ise deri biyopsileri alınmalıdır [123, 124]. TDM enfeksiyonu şüphesi varlığında laboratuvar bilgilendirilmelidir. Özellikle belirli bir tür üzerinde duruluyorsa, bu türe özgü üreme sıcaklığında inkübasyon, boyama ve kültür teknikleri ile izolasyon şansı artırılabilir. Özellikle balgam örnekleri kontaminasyona açık olduğundan dolayı mutlaka dekontaminasyon işleminden geçirilmelidir. Dekontaminasyon N-asetil L-sistein-NaOH, oksalik asit ya da klorheksidin ile yapılabilir [12, 121, 125-127].

Dekontaminasyon sonrası TDM şüpheli örnek aside dirençli boyama yöntemiyle boyanır. Ziehl ve Neelsen tarafından geliştirilen bu yöntem, hücre duvarında mikolik asit içeren *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Nocardia* türlerinin boyanmasında kullanılmaktadır [128-130].

Mikobakterilerin tanısında altın standart yöntem kültürdür. Mikobakteriler üretilmesi zor mikroorganizmalar olduklarından dolayı özel besiyerlerine gereksinimleri vardır [131]. Mikobakterilerin tanısında bir adet katı ve sıvı besiyeri kullanılması önerilmektedir. Yumurta bazlı katı besiyeri olarak en sık Lowenstein-Jensen besiyeri kullanılmaktadır. Agar bazlı katı besiyerleri içerisinde Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 bulunmaktadır. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeridir. Sıvı besiyerlerinde üreme zamanı katı besiyerlerine göre daha kısadır. Sıvı besiyerlerinin katı besiyerlerine göre kontaminasyona daha açık olması ise dezavantajlarından biridir. Ayrıca mikobakterilerin üretilmesinde otomatize sistemlerin de önemli bir yeri vardır. Mikobakteri Üreme Belirleme Tüpü (*Mycobacterium Growth Indicator Tube*=MGIT), modifiye Middlebrook 7H9 içeren otomatize sıvı besiyeridir. TDM türlerinin saptanmasında %98.8 duyarlılık, %100 özgüllülüğe sahip olduğu bildirilmiştir [131-133].

TDM tanımlanmasında kullanılan testler içerisinde konvansiyonel biyokimyasal testler ve moleküler testler yer almaktadır. Konvansiyonel testler içerisinde, katalaz üretimi, arilsülfataz, nitrat redüksiyonu, sodyum klorür toleransı, demir kullanımı gibi çok sayıda test yer almaktadır. Bu testlerin uygulanması için mikroorganizmaların kültür ortamında üretilmesi gerektiğinden tanımlama işlemleri zaman alıcı olmaktadır. Ayrıca bu testlerin TDM türleri arasında ayırt ediciliği ve

tekrarlanabilirliği düşüktür. TDM türlerinin tanımlanmasında, günümüzde moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte biyokimyasal testlerin kullanımı azalmıştır [134].

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (*High Performance Liquid Chromatography*=HPLC) mikolik asit analizine göre özellikle yavaş üreyen TDM türlerinin tanımlanmasında tercih edilen bir yöntemdir. HPLC analizinde, karbon uzunluğu ve yüküne göre farklı mikolik asit dizileri ayrıştırılmaktadır. Sık karşılaşılan türlerin (*M. avium*, *M. kansasii*) tanımlanmasında faydalı bulunsa da TDM türlerinin ayırt edilmesinde etkinliği düşük bulunmuştur. Günümüzde daha çok referans laboratuvarlarda kullanılmaktadır [10].

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (*Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry*=MALDI-TOF MS) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) TDM türlerinin tanımlanmasında kullanılan diğer testlerdir [124]. MALDI-TOF MS, mikrobiyal proteinlerin analiz edilmesi prensibine dayanan bir tekniktir. MALDI-TOF MS, ucuz ve pratik olması yönüyle moleküler testlere göre daha avantajlıdır. Bu teknikte, tanımlanması istenen mikroorganizma kolonisi matriks adı verilen organik bir sıvı bileşen ile karıştırılır ve oda ısısında kurumaya bırakılarak mikroorganizmanın matriks içerisinde kristalize olması sağlanır. Ardından, lazer ışınlarının uyarımı ile tek protonlu iyonlar açığa çıkar. Bu iyonlar daha sonra kütle-yük oranlarına göre ayrıştırılarak uçuş tüpü içerisindeki dedektöre ulaşma süresi ölçülür. Bu şekilde oluşan kütle spektrumu, yazılımda yer alan veri tabanı ile karşılaştırılır. MALDI-TOF MS, TDM türlerinin tanımlanmasında başarılıdır. Genetik olarak yakınlık gösteren TDM türlerinin ayırt edilmesinde (örneğin *M. intracellulare* ve *M. chimaera*) etkinliği düşük bulunmuştur [135].

PZR temelli testler, TDM türlerinin tanımlanmasında basit, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Günümüzde özellikle solunum sisteminde etken olan TDM türlerinin PZR temelli testler ile tanımlanması için sendromik paneller geliştirilmektedir. “*Line-probe*” temelli PZR testleri, TDM türlerinin tanımlanmasında ve aminoglikozid ve markolid direncinin saptanmasında kullanılmaktadır [124].

Dizileme teknolojileri, de mikobakterilerin tanısında ve mutasyonların saptanmasında kullanılmaktadır [136]. 1970’lerde Allan Maxam ve Water Gilbert,

nükleotidlerin kimyasallarla modifikasyonuna ve radyoaktif izotop ile işaretlenmesi prensibine dayanan bir DNA dizileme yöntemi geliştirmişlerdir. Frederick Sanger ve arkadaşları ise aynı yıllarda nükleotidlerin boyalarla boyanarak işaretlenmesi prensibine dayanan daha etkili ve uygulaması kolay bir yöntem geliştirmişlerdir [137, 138]. Zincir sonlandırma yöntemi, Sanger dizilemesi ya da dideoksi dizilemesi olarak farklı isimlerle anılan bu yöntem, DNA dizileme yöntemi olup DNA bölgelerinin baz analizini sağlamaktadır. Bu yöntemde dideoksinükleotid trifosfatlar (dd-NTP) kullanılmaktadır. Normal koşullarda d-NTP, iki nükleotid arasında fosfodiester bağının oluşturulmasını sağlayan 3'-OH grubuna sahiptir. 3'-OH grubu yerine hidrojen bulunduran bulunduran dd-NTP, fosfodiester bağının kurulamamasına bağlı olarak sentezi durdurmaktadır. Bu yöntemin birinci basamağında PZR ile hedef bölgeler çoğaltılır. Deoksinükleotid trifosfatlardan (d-NTP) olan deoksiadenozin trifosfat (d-ATP), deoksitimidin trifosfat (d-TTP), deoksisitidin trifosfat (d-CTP) ve deoksiguanozin trifosfat (d-GTP), dört ayrı reaksiyonda, her reaksiyonda sadece bir d-NTP çeşidi bulunacak şekilde eklenir. Tek sarmallı bir kalıp DNA zinciri, DNA primeri, DNA polimeraz ve florokrom boyasıyla işaretli d-NTP varlığında gerçekleşen in vitro DNA replikasyonu esnasında ortama dd-NTP eklenmesi halinde (ortamdaki diğer maddelerden daha düşük miktarda olacak şekilde) d-NTP ve dd-NTP arasında bağlanma yarışı ortaya çıkar. d-NTP bağlanması zincirin uzamasını sağlarken dd-NTP bağlanması ile zincirin uzaması durdurulur. Bu şekilde her reaksiyonda farklı uzunlukta DNA fragmanları ortaya çıkar. Daha sonra kapiller jel elektroforezi uygulunarak DNA fragmanlarından farklı spektrumlarda yayılan ışınlar kaydedilir ve bu şekilde DNA fragmanları ayrıştırılır. DNA'daki baz dizileri ortaya çıkarılır [139]. Sanger dizilemesinde, dizinin ilk 15-40 bazlık kısmı primerin bağlanmasına bağlı olarak doğru okunamayabilir. Ayrıca 700-900 bp'den uzun dizilerin okunması pek mümkün olmamaktadır [140].

TDM tanımlamasında günümüzde kısmi gen dizilemesi popüler hale gelmiştir. 16S rDNA en sık kullanılan hedef bölgedir. Bunun dışında *hsp65* ve 16S-23S dahili transkripsiyonlu aralayıcı bölgeler (*Internal Transcribed Spacer=ITS*) de kullanılmaktadır. Dizi analizi, günümüzde TDM türlerinin tanımlanmasında altın standart olarak bildirilse de çeşitli kısıtlılıkları vardır. Örneğin, *M. chelonae* ve *M.*

abscessus'un 16SrDNA lokusundaki dizileri aynı olduğundan dolayı klinik açıdan önemli olan bu iki tür 16S rDNA analizi ile birbirlerinden ayırt edilememektedir.

2.11. TDM-Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

TDM enfeksiyonlarının tedavisi multidisipliner yaklaşım gerektirmekte olup çoklu ilaç rejimleri ve uzun süreli tedaviye ihtiyaç duyulan kompleks bir süreçtir [124]. Ancak, etkin bir tedavi için TDM'ler tür düzeyinde tanımlanmalıdır. Ampirik tedavide hızlı üreyen TDM'ler için amikasin, imipenem ya da makrolid grubundan bir antibiyotik tercih edilebilir.

Mikobakterilerin antibiyotik duyarlılık testlerinde Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (*Clinical and Laboratory Standarts Institute=CLSI*) ve Amerikan Toraks Derneği/Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (*American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America=ATS/IDSA*) tarafından yayımlanan kılavuzlar kullanılmaktadır. Mikobakteriler için agar proporsiyon yöntemi, disk difüzyon testi, sıvı makrodilüsyon gibi çeşitli antibiyotik duyarlılık yöntemleri geliştirilmiş olsa da günümüzde CLSI önerilerine göre standart yöntem "sıvı mikrodilüsyon"dur [141-143]. Kan, BOS, yumuşak doku gibi steril vücut bölgelerinden izole edilmesi, immünespresif konakta meydana gelmesi, çok sayıda ve yüksek hacimli örneklerden izole edilmesi durumunda TDM enfeksiyonları klinik olarak anlamlı kabul edilmelidir [144]. Ayrıca uygun antibiyotik tedavisine rağmen üç aydan uzun süreli persistan enfeksiyon varlığında da antibiyotik duyarlılık testi çalışılması önerilmektedir [12]. TDM türlerinde sadece belli antibiyotiklerin in vitro MİK değerleri klinik yanıtla ilişkilendirilmiştir. TDM türlerinde kılavuzda önerilen antibiyotik ya da antibiyotiklere karşı direnç saptanması durumunda daha geniş panellerde antibiyotik duyarlılık testleri çalışılabilir.

Yavaş üreyen TDM türlerinde, MAK enfeksiyonlarında, rifampisin/rifabutin, etambutol, makrolid (klaritromisin ve azitromisin), streptomisin ve amikasin; *M. kansasii* enfeksiyonlarında izoniazid, rifampisin/rifabutin ve klaritromisin, *M. marinum* enfeksiyonlarında ise rifampisin, klaritromisin, azitromisin, trimetoprim sülfometoksazol duyarlılıkları test edilmesi önerilmektedir [11].

Hızlı üreyen TDM türlerinde yavaş üreyenlere göre daha geniş panelde antibiyotik duyarlılık testleri çalışılması önerilmektedir [11, 145]. Hızlı üreyen TDM türlerinde geniş panelde yer alan antibiyotikler klaritromisin, amikasin, trimetoprim sülfametoksazol, tobramisin, sefoxitin, siprofloksasin, klaritromisin, doksisisiklin, imipenem, linezolid, moksifloksasin, tigesiklin, klofazimidir [11].

2.12. *M. fortuitum* Antimikrobiyal Duyarlılık Profili-Tedavi

M. fortuitum'a bağlı enfeksiyonların tedavisinde ikili-üçlü antibiyotik tedavisi önerilse de bu kombinasyonda hangi antibiyotiklerin birlikte kullanılması standardize edilmemiştir. Monoterapi sıklıkla direnç gelişimine yol açıp tedavi başarısızlığı ya da relapslarla sonuçlanmaktadır. *M. fortuitum* izolatları genellikle birinci sıra tüberküloz ilaçlara dirençli kabul edilir. *M. fortuitum* tedavisi genellikle uzun süreli olup enfeksiyon odağına göre değişkenlik gösterir. *M. fortuitum*'a bağlı gelişen pulmoner enfeksiyonlarda tedavi süresi 12 ay olarak önerilmektedir [146, 147]. Makrolid grubu antibiyotiklerden klaritromisin, *M. fortuitum* enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir yere sahiptir [148]. Tedavinin ilk 2-6 ayında amikasin ve sefoksitine ek olarak levofloksasin önerilirken sonraki 6-12 ayda trimetoprim-sülfometaksazole ek olarak doksisisiklin ya da levofloksasinden biri seçilmesi önerilmektedir. Yaygın enfeksiyonlar da benzer antibiyotiklerle 4-6 ay süreyle tedavi edilir [147]. Yara yeri enfeksiyonlarında tedavi lezyonun büyüklüğü ve derinliğine göre değişir. Lokal yara bakımı ve antibiyotik tedavisine ek olarak derin yaralarda cerrahi debritleme gerekebilir [149]. Bedakulinin florokinolonla kombinasyonu, kronik yara yeri enfeksiyonunun tedavisinde başarılı bulunmuştur [150]. Ayrıca yeni tüberküloz ilaçlarından olan delamanid ve pretomanidin de in vitro olarak TDM enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olabileceği bildirilmiştir [124]. Deri enfeksiyonlarında tedavi süresi en az 4-6 ay olup minosiklin veya doksisisiklinden biri ve florokinolon veya trimetoprim-sülfometaksazolden birinin kullanılması önerilmektedir [12].

Klaritromisin, 14 üyeli, yarı sentetik, makrolid grubunda yer alan bir antibiyotik olup eritromisinden elde edilmiştir. Klaritromisin ilk kez 1980 yılında Japonya'da üretilmiştir [151]. Klaritromisin bakterilerin 50S ribozomal birimine

bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Hem bakteriyostatik hem de bakterisidal etki gösterir. *erm (39)* geni metilaz enzimini kodlar ve metilaz enzimi, 23S rRNA'ya bir ya da iki metil grubu bağlayarak makrolidlerin ribozoma bağlanmasını ve etki göstermesini engeller. İndüklenebilir *erm* geni taşıyan *M. fortuitum* izolatlarında tedavide klaritromisin kullanımı esnasında dikkatli olunmalıdır. İnvitro olarak duyarlı bulunan izolatlar, klaritromisin tedavisi altındayken indüklenebilir *erm (39)* geninin aktive olmasıyla klaritromisine dirençli hale gelebilir. Amerikan Toraks Deneği'ne göre *M. fortuitum* izolatlarının %80'i klaritromisine duyarlı olsa da indüklenebilir *erm (39)* genine bağlı olarak tedavi altında direnç gelişimi söz konusu olabilir. Bu durumda, beklenen tedavi başarısı sağlanamayabilir [13, 148, 152]. *M. abscessus* ve *M. fortuitum* türlerinde iM direncinin araştırılması için inkübasyon 14 güne uzatılmalıdır [124, 141, 145].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *M. fortuitum* İzolatları

Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tüberküloz Epidemiyolojisi Laboratuvarı ve Ankara Atatürk Sanatoryum Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Tüberküloz Birimi'nde izole edilen ve tanımlanan 40 *M. fortuitum* izolatı dahil edilmiştir. Daha önceden, MALDI-TOF MS ve *hsp65* dizi analizi ile tanımlanan izolatlar test edildi.

Bu çalışmada antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kalite kontrol suşu olarak CLSI M24S kılavuzunda önerilen *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection, ATCC 29213) suşu ve duyarlı olduğu bilinen *Mycobacterium peregrinum* (ATCC 14476) suşu kullanılmıştır [153]. Biyofilm testinde ise biyofilm oluşturduğu bilinen *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) suşu kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

Löwenstein Jensen besiyeri

Katyon ayarlı Mueller Hinton besiyeri

Middlebrook 7H9 besiyeri

Kristal viyole

Etanol (%95)

Fosfat tamponlu su (PBS)

Tween-80

Gliserol

OADC (oleik asit, albümin, dekstroz, katalaz)

Klaritromisin

Distile su

Eldiven

Cam boncuk

Tüp Sporu
Tek kanallı mikropipet
Çok kanallı mikropipet
Pipet uçları
Standart U tabanlı 96 kuyucuklu plak
Standard düz tabanlı 96 kuyucuklu plak
50ml konik tüp
Enjektör filtresi
Dimetil sülfoksit (DMSO)
Dansitometre
Otoklav
Santrifüj tüpü
-80°C'ye dayanıklı mikrosantrifüj tüpü
Santrifüj cihazı
Etüv
Hassas Terazî
Sınıf 2 biyogüvenlik kabini
Santrifüj cihazı
Vorteks
Cam tüp (16X10mm)
+4°C Buzdolabı
-20°C derin dondurucu
-80°C derin dondurucu
Antibiyogram sonuçlarını okumak için konkav ayna ve büyüteç
Spektrofotometre cihazı

3.3. *M. fortuitum* İzolatlarının Besiyerine Ekimi ve Üretilmesi

Bu çalışmada kullanılan *M. fortuitum* izolatları, Sınıf 2 biyogüvenlik kabini içinde, kişisel koruyucu malzeme (eldiven, önlük, N95 maske) kullanılarak, laboratuvar biyogüvenliği kurallarına uyularak, steril şartlarda, -20°C derin dondurucudan çıkartılarak oda ısısında çözülmüştür. İzolatlar, Löwenstein-Jensen ve Middlebrook 7H9 besiyerlerine ekilmiştir. Löwenstein-Jensen besiyerine 100 µl bakteri çözeltisi eklenmiştir ve 37°C'lik etüvde yaklaşık 5-7 gün boyunca düzenli olarak üreme ve kontaminasyon kontrolleri yapılmıştır. Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen kolonilerin görünümü Şekil 3.1.'deki gibidir. Koloniler, Middlebrook 7H9 besiyerine ekilmiştir. 7ml Middlebrook 7H9 sıvı besiyerine 800 µl oleik asit, albümin, dekstroz, katalaz (OADC) ve 500 µl örnek eklenmiştir ve 37°C'lik etüvde beş gün inkübe edilmiştir. Beş gün boyunca düzenli olarak her gün izolatların üreme ve kontaminasyon kontrolleri yapılmıştır.



Şekil 3. 1. Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen *M. fortuitum* kolonilerinin görünümü

3.4. *M. fortuitum* İzolatlarının Kinyoun Yöntemiyle Boyanması

Bu amaçla Kinyoun aside dirençli boyama yöntemi kullanılmıştır. Üremiş kültürden lam üzerine yayılan *M. fortuitum* kolonileri üç kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Ardından karbolfuksin damlatılarak 5 dk beklenmiştir. Yıkama sonrasında asit-alkol eklenip 3 dk beklenmiştir. Yıkama yapıldıktan sonra metilen mavisi uygulanmıştır. 1 dk bekledikten sonra son yıkama işlemi yapılmıştır. Lamalar kuruduktan sonra ışık mikroskopunda, 100X'lük objektifte inceleme yapılmıştır. Mavi zeminde kırmızı renkli olarak görülen basiller ARB (+) olarak raporlanmıştır [154].

3.5. *M. fortuitum* İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

M. fortuitum izolatlarının klaritromisin antimikrobiyal duyarlılık testleri, CLSI M24 rehberinin önerdiği sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak çalışılmıştır [11]. Bu amaçla hassas terazide 10 mg klaritromisin tartılmıştır. Klaritromisin 700 µl DMSO'da çözülmüş ve 9 ml distile su eklenerek 1024 µg/ml konsantrasyonda antibiyotik süspansiyonu elde edilmiştir. Hazırlanan stok antibiyotik süspansiyonu mikrosantrifüj tüplerine konularak -20°C'de saklanmıştır Her çalışmada bir mikrosantrifüj tüpü çözülerek kullanılmıştır. Test edilecek klaritromisin duyarlılığı için 96 kuyucuklu mikropaklar 0.06-32 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Bunun için, katyon ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyeri ile cam tüplerde iki kat seri dilüsyonlar yapılarak 0.125 µg/ml'den 64 µg/ml'ye kadar antibiyotik süspansiyonu konulmuştur. Bakterilerin eklenmesiyle hedeflenen konsantrasyonlar elde edilmiştir. Her izolat için 96 kuyucuklu mikropakta 1 numaralı kuyucuktan 10 numaralı kuyucuğa kadar, her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde hazırlanmış seri antibiyotik konsantrasyonları eklenmiştir.

Middlebrook 7H9 besiyerinde üremiş olan kolonilerden 3mm boyutunda cam boncuklar (yaklaşık 7-10 adet) kullanılarak distile su içinde (4.5 ml) 0.5 McFarland yoğunlukta bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. İyice vorteksenerek (15-20 sn) homojenize olması sağlanmıştır. Her izolat için 0.5 McFarland yoğunlukta hazırlanan bakteri süspansiyonundan 50 µl alınarak 10 ml katyon ayarlı Mueller-Hinton besiyeri

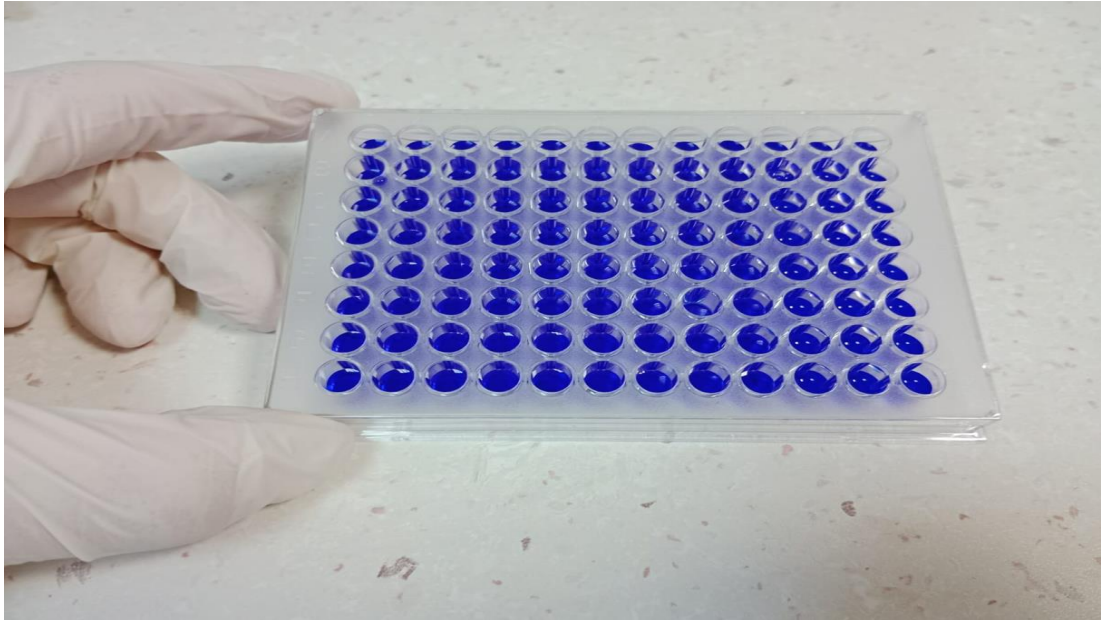
için cam tüplerde seyreltilmiştir. Birden 11 numaralı kuyucuğa kadar, her kuyucuğa 100 µl bakteri çözültisi konulmuştur. Mikroplaklar 30±2 °C'lik etüvde inkübe edilmiştir. On bir numaralı kuyucuk üreme kontrol, 12 numaralı kuyucuk sterilite kontrol olarak kullanılmıştır. Her izolat iki kez test edilmiştir.

İnkübasyonun ilk beş günü, günlük olarak test kuyucuklarındaki üremeler görsel olarak konkav ayna ve büyüteç yardımıyla değerlendirilip üremenin tamamen inhibe olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak alınmıştır. İnkübasyon süresi 14 güne uzatılarak indüklenabilir iM açısından değerlendirilmiştir [11].

3.6. *M. fortuitum* İzolatlarında Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

Biyofilm oluşumunun araştırılması için Sharma ve ark'nın önerdiği şekilde kristal viyole ile boyama tekniği kullanılmıştır [155]. Biyofilm besiyeri oluşturmak amacıyla Middlebrook 7H9 sıvı besiyerine %10 OADC, %0.5 gliserol ve %0.1 Tween eklenmiştir. Kırk *M. fortuitum* izolatı, beş gün, 35°C'de inkübe edilmiştir. Biyofilm oluşumunun indüklenmesi açısından mikroplaklar günlük olarak ısıtıcılı karıştırıcıda çalkalanmıştır. Dansitometre cihazında OD 600'de 0.4 McFarland (10⁷ CFU/ml) yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanıp biyofilm besiyeri ile 1:10 oranında seyreltilmiştir. 200 µl bakteri süspansiyonu 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklara eklenmiştir. Her izolat için mikroplakta üç ayrı kuyucuk kullanılmıştır. Mikroplakta nemli atmosfer yaratmak için mikroplağın kenar ve köşelerindeki kuyucuklara 225 µl distile su konulmuştur. Ayrıca mikroplak parafilm ile kaplanarak sıvı kaybı en aza indirilmiştir. Biyofilm oluşumu için dört günlük inkübasyon sağlanmıştır. Her test için negatif kontrol olarak kullanılan ve inokülüm içermeyen biyofilm besiyerinden 200 µl üç ayrı kuyucuğa eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak *M. fortuitum* ATCC 6841 izolatı kullanılmıştır. Dördüncü gün sonunda mikroplak içerisindeki sıvı dökülmüştür ve ardından adezyon göstermeyen bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması için her kuyucuk 200 µl distile su ile üç kez yıkama işleminden geçirilmiştir. Daha sonra kuyucuklara, %1 konsantrasyonda 200 µl kristal viyole eklenip 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir (Şekil 3.2.). Mikroplak içeriği dökülerek kristal viyolenin ortamdan

uzaklaşması sağlandıktan sonra kalan boyanın uzaklaştırılması için test kuyucukları 200 µl distile su ile üç kez yıkanmıştır ve sonrasında mikropalak oda ısısında kurumaya bırakılmıştır. Ardından 100 µl %95 etanol eklenmiştir ve oda ısısında 15 dk inkübasyon sağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında mikropalak 570 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okutulmuştur ve optik dansite (OD) değerleri kaydedilmiştir.



Şekil 3. 2. Kristal viyole eklenmiş biyofilm mikroplağının görünümü

3.7. Sanger Dizi Analizi

3.7.1. DNA İzolasyonu

M. fortuitum izolatlarının DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesinde “GeneMATRIX Plant & Fungi Purification” kiti kullanılmıştır. Bu amaçla *M. fortuitum* izolatlarının Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiş taze kültürleri kullanılmıştır. DNA izolasyonunda uygulanan basamaklar şu şekildedir: İzolasyon aşamasından hemen önce spin-kolon membranının nemlendirilmesi ve bu şekilde DNA'nın daha kolay nüfuz etmesini sağlamak amacıyla spin-kolona 30 µl aktivasyon tamponu P eklenmiştir. İki ml'lik mikrosantrifüj tüpünde öze ile alınan üç-dört adet

M. fortuitum kolonisi 400 µl lizis tamponu F ile çözdürülmüştür. 3 µl RNAaz A ve 10 µl Proteinaz K eklenmiştir. Karışım iyice vortekslendikten sonra 65°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. 130 µl AC nedir tamponu eklenip iyice karıştırıldıktan sonra buz kalıbı üzerinde 5 dk bekletilmiştir. 14.000 g’de 10 dk santrifüj uygulanmıştır. Üst sıvıdan (supernatant) 400 µl alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpü içerisine (2ml’lik) transfer edilmiştir. Ardından 350 µl Sol P tamponu ve 250 µl %96 etanol eklenmiştir ve tüpün iyice karışması sağlanmıştır. 12.000 g’de 1 dk santrifüj uygulanmıştır. 600 µl üst sıvı (supernatant) toplama tüpü içerisinde yer alan spin kolona eklenmiştir. 11.000 g’de 1 dk santrifüj sonrası toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır. 500 µl PX yıkama tamponu eklenmiştir, 11.000 g’de 1 dk santrifüj yapılmıştır ve toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır. (Yıkama işlemi bir kez daha tekrar edilmiştir). Spin kolonun yıkama tamponundan arındırılması için bir kez daha 11.000 g’de 1 dk santrifüj yapılmıştır ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 100 µl elüsyon tamponu eklenmiştir ve oda ısısında 2 dk inkübe edilmiştir. 11.000 g’de 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra spin-kolon atılmıştır. Toplama tüpünde, elüsyon tamponu içerisinde izole edilen DNA örneği PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.

3.7.2. Hedef DNA’nın PZR ile Çoğaltılması ve İşaretlenmesi

Bu çalışmada, *M. fortuitum* izolatlarında *erm (39)* gen varlığı araştırılmıştır. Bu genin çoğaltılmasında kullanılan primer dizilerinin içeriği Tablo 3.1.’de verilmiştir. Primerlerin tasarlanmasında Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (*National Center for Biotechnology Information=NCBI*)’nde yer alan *Primer-BLAST* aracı kullanılmıştır. *M. fortuitum erm (39)* (Gen Bankası erişim numarası: MK468780.1) kullanılarak tasarlanan primerlerle yaklaşık 649 bç’lik bir bölgenin çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu karışımlar Tablo 3.2.’de belirtilen miktarlarda mikrosantrifüj tüpü içerisinde karıştırıldıktan sonra 3 µl DNA örneği eklenmiştir ve distile su ile 35 µl’ye tamamlanmıştır. PZR reaksiyonunda “*Solis Biodyne (Estonya) FIREPol*” Taq polimeraz enzimi kullanılmıştır. PZR çalışması, “*Kyratec Thermocycler*” termal döngü cihazında yapılmıştır.

Tablo 3. 1. *erm* (39) geninin PZR'de çoğaltılması için kullanılan ileri (*forward=F*) ve ters (*reverse=R*) primer dizileri

erm39-F (5'→3')	CATGAGAACGGCCAGAATTT
erm39-R (5'→3')	GAATTCCGTTGGCAGACAG

Tablo 3. 2. PZR bileşenleri

<i>Bileşen</i>	<i>Stok Konsantrasyonu</i>	<i>Reaksiyon Konsantrasyonu</i>
PZR Tamponu	10 X	1 X
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
dNTP Karışımı	20 mM	0,2 mM
İleri Primer	10 µM	0,3 µM
Ters Primer	10 µM	0,3 µM
Taq DNA Polimeraz	5U/µl	2U

PZR reaksiyonu 95°C'de, 5 dk başlangıç denatürasyonu ve ardından 30 döngüden oluşacak şekilde programlanmıştır. Her döngüde sırasıyla; 95°C'de 45 sn denatürasyon, 57°C'de 45 sn primer bağlanması (*annealing*), 72°C'de 60 sn uzama ve 72°C'de 5 dk son uzama basamakları yer almıştır. Ardından sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PZR reaksiyonu tamamlanmıştır.

3.7.3. Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulanması

PZR sonrasında sentezlenen ampliconların görüntülenmesi için %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bu amaçla, jel tepsinin kenarları bant ile kapatılmıştır. Yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilmiştir. Tris Asetik Asit EDTA (50 X konsantrasyonda) solüsyonunun hazırlanması için; 242 gr tris bazı tartılarak 57.1 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml 0.5M EDTA (pH=8) ile çözülmüştür ve distile su eklenerek 1 litreye tamamlanmıştır. Daha sonra, 50 X TAE, 1:50 oranında seyretilerek 1 X TAE elde edilmiştir. Bir gr agaroz hassas terazide tartıldıktan sonra 100 ml 1 X

TAE tamponu içinde çözülmüştür. Ardından, agaroz tamamen eriyene kadar ısıtıcıda ısıtılmıştır. 45°C -50°C'ye kadar soğutulduktan sonra son konsantrasyon 0,5µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklenmiştir. Etidyum bromürün iyice karışması sağlandı. Tarakların önceden yerleştirilmiş olduğu agaroz jel elektroforezi aparatına jel dökülmüştür. Yirmi dk oda ısısında tutularak jelin katılaşması sağlandıktan sonra taraklar ve bant yerinden çıkarılıp aparat elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jelin yüzeyini kaplayacak şekilde 1 X TAE tamponu eklenmiştir. Üç µl örnek 3 µl “Orange G” yükleme tamponu ile karıştırılarak jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. Birinci kuyucuğa moleküler ağırlık standardı yüklenmiştir. Akım yönünün katottan anoda doğru olması sağlandıktan sonra 100 V akımda 60 dk yürütülerek UV ışığında görüntülenmiştir [156].

3.7.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR ürünlerinin saflaştırılması için “MAGBIO *HighPrep*TM PCR Clean-up System” (AC-60005)” saflaştırma kiti kullanılmıştır. Bu aşamada PZR ürünlerinden tuz, dNTP, enzim, dimer ve primerler uzaklaştırılmıştır. Bu kit manyetik boncuklarla manyetik alan oluşturularak DNA ürünlerinin bağlanmasını esas almaktadır. Pürifikasyon aşamasında yer alan basamaklar şu şekildedir: Kit kullanımdan 30 dk önce oda ısısına getirilmiştir. PZR ürünlerinden 10 µl alınarak 2 ml'lik RNAaz-DNAaz içermeyen tüplere transfer edilmiştir. Tüplere 18 µl *HighPrep*TM reaktifi eklenmiştir ve iyice pipetlenerek karıştırılmıştır. Oda ısısında 5 dk inkübasyon sağlanmıştır. Tüpler 3 dk süreyle manyetik ayırma cihazına yerleştirilmiştir. Manyetik boncuklara yapışmış DNA örneğine dokunulmadan nazikçe üstte kalan sıvı pipetlenerek atılmıştır. İkiyüz µl %80 etanol eklenmiştir ve 30 sn oda ısısında bekletilmiştir. Manyetik boncuklara yapışmış DNA örneğine dokunulmadan nazikçe üstte kalan sıvı pipetlenerek atılmıştır. Bir kez daha 200 µl %80 etanol eklenmiştir ve 30 sn oda ısısında bekletilmiştir. Manyetik boncuklara yapışmış DNA örneğine dokunulmadan nazikçe üstte kalan sıvı pipetlenerek atılmıştır. Manyetik boncuklara yapışmış DNA örnekleri 15 dk oda ısısında bekletilerek kurumaları ve alkolden arınması sağlanmıştır. Manyetik ayırma cihazından çıkarılan tüplere 40 µl elüsyon tamponu

eklenmiştir ve birkaç kez pipetlenerek iyice karışması sağlanmıştır. Tüpler, 2 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Tüpler 3 dk süreyle manyetik ayrıştırma cihazına yerleştirilmiştir. Manyetik boncuklardan ayrılan eluat yeni tüplere aktararak numaralandırılmıştır ve -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.7.5. DNA Miktar Tayini

Bu amaçla florometrik ölçüm prensibiyle çalışan “*iQuant dsDNA HS Assay*” kiti ve “*Qubit 3.0 Fluorometer*” cihazı kullanılmıştır. Bir µl reaktif solüsyonu 199 µl dilüsyon tamponu ile 1:200 oranında seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Her örnek için 198 µL çalışma solüsyonu tüplere aktarılmıştır. Ardından bu tüplere 2 µl örnek eklenerek iyice vortekslenmiştir ve sonrasında oda ısısında 2 dk bekletilmiştir. Daha sonra “dsDNA high sensitivity” programı kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

3.7.6. Dizileme Reaksiyonu

Çift yönlü Sanger sekans analizi için “*ABI 3730XL*” Sanger dizileme cihazı (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) ve “*BigDye Terminator v3.1 Cycle*” dizileme kiti kullanılmıştır (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Dizileme reaksiyonu PZR ürünlerinin dizilenmesi için “*BigDye Terminator v3.1*” kiti kullanılmıştır. PZR ürünü ve özgül primerler, kit içerisinde yer alan *Sequencing Buffer (5X)*'a eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışımın içerisinde yer alan bileşenlerin miktarı Tablo 3.3.'te yer verilmiştir. Bu karışım, ileri primer ve ters primerin ayrı ayrı yer aldığı iki ayrı PZR tüpünde (0.5 ml'lik) hazırlanmıştır.

Tablo 3. 3. Dizileme reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar
<i>Bigdye Terminator v3.1</i> Kiti Hazır Reaksiyon Karışımı	4 µL
<i>Sequencing Buffer 5X</i>	4 µL
PZR Ürünü	2 µL
Primer	0,5 µL
Distile Su	9,5 µL
Reaksiyon Hacmi (Toplam)	20 µL

PZR tüpleri daha sonra termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. Termal döngü reaksiyonunun programı Tablo 3.4.'te gösterildiği gibidir. 96°C'de, 1 dk başlangıç denatürasyonu ve ardından 25 döngüden oluşacak şekilde programlanmıştır. Her döngüde sırasıyla; 96°C'de 10 sn denatürasyon, 50°C'de 5 sn primer bağlanması (=annealing), 60°C'de 4 dk uzama basamakları yer almıştır. PZR reaksiyon ürünleri 4°C'de saklanmıştır.

Tablo 3. 4. Sanger dizileme aşamasında yapılan PZR döngü koşulları

Döngü Basamağı	Süre	Sıcaklık
İlk Denatürasyon	1 dk	96°C
Denatürasyon	10 sn	96°C
Bağlanma	5 sn	50°C
Uzama	4 dk	60°C

3.7.7. Dizileme Aşaması

Dizileme reaksiyonu sonrasında oluşan DNA ürünlerinin içerdiği baz dizilerinin sırasını belirlemek amacıyla dizileme yöntemi uygulanmıştır. Bu aşamada DNA fragmanlarındaki farklı bazları farklı dalga boyunda boyayan floresan boyalar kullanılmıştır. “ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer” marka dizileme cihazına yerleştirilen ürünler, kısa süreli elektroforez ile katottan anoda ve kapiller sisteme doğru taşınmıştır. Kapillerde DNA materyali tarafından bant oluşumu ortaya çıkmıştır ve ardından oluşan bu bant ileri elektroforez ile molekül ağırlığı ve yüküne göre

elektriksel alanda ayrıştırılmıştır. DNA fragmanları kapiller pencereden ilerlerken argon-iyon lazer uyarımı ile floresan boyalar tarafından ışımaya oluşturulmuştur. Oluşan floresan ışıklar spektrografiye odaklandırılmıştır ve dalga boyuna göre ayrılarak ham veri oluşturulmuştur. Bu ham veriler ile *ABI PRISM® 310* veri toplama yazılım programı ile farklı renklerin farklı dalga boylarına karşılık geldiği filtreler oluşturulmuştur. Bu filtrelerde yer alan dört çeşit renk (kırmızı: T, siyah: G, mavi: C, yeşil: A) oluşturan floresan boyalara karşılık gelen bazlar "*FinchTv versiyon 1.4*" yazılım programı kullanılarak kromatogram görüntüsü tanımlanmıştır [157]. Kromatogramdan elde edilen baz dizileri NCBI'de Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (*Basic Local Alignment Search Tool=BLAST*) analizine tabi tutulmuştur ve her izolat için elde edilen dizilerin hedef gene (*erm (39)*) ait olup olmadığı kontrol edilmiştir. "*FinchTv versiyon 1.4*" yazılım programından elde edilen nükleotit dizileri FASTA formatına dönüştürülmüştür. FASTA formatındaki diziler "*MultAlin versiyon 5.4.1*" yazılım programı kullanılarak hizalama işlemi gerçekleştirilmiştir [158]. "*MEGA versiyon 1.1*" yazılım programı kullanılarak elde edilen nükleotit dizilerine karşılık gelen amino asit dizileri belirlenmiştir [159]. Referans dizi olarak *M. fortuitum sub. fortuitum* ATCC6841, DSM 46621, *erm (39)* (Gen Bankası erişim numarası: NG_047782) kullanılmıştır.

3.7.8. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Sürekli değişkenleri (standart sapma, minimum, medyan, maksimum) tanımlamak için tanımlayıcı istatistikler kullanılmıştır.

Normal dağılıma uygunluk göstermeyen iki sürekli değişken arasındaki ilişkiyi analiz etmek için Spearman's rho korelasyon analizi kullanılmıştır. Bağımsız ve normal dağılıma uygunluk göstermeyen iki değişkenin karşılaştırması Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla Ki-Kare (ya da uygun yerlerde Fisher Exact test) kullanılmıştır. Normal dağılıma uymayan ikiden fazla gruba ait sürekli değişkenlerin karşılaştırması Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Bağımlı ve normal dağılıma uygun olmayan birden fazla sürekli değişken arasındaki değişim Friedman test, Post-Hoc analizleri ise bağımlı ve normal

dağılıma uygun olmayan iki sürekli değişken arasındaki ilişki için Wilcoxon Signed Rank test ile incelenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak belirlenmiştir. Analizler MedCalc Statistical Software version 12.7.7 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2013) Programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klaritromisin Duyarlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasına 40 adet *M. fortuitum* izolatı dahil edilmiştir. Bu izolatların klaritromisine karşı duyarlılık çalışması, CLSI M24 rehberinin önerisi doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır. Elde edilen MİK değerleri CLSI M24S rehberinde yer alan ve Tablo 4.1’de verilen sınır değerleri kullanılarak duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak yorumlanmıştır. Üreme kontrol kuyucuğunda yeterli üreme saptanmaması durumunda test değerlendirilmemiş ve tekrar edilmiştir. Negatif kontrolde üreme belirtisi saptanması durumunda kontaminasyon olarak kabul edilip yeniden çalışılmıştır.

M. fortuitum izolatlarının mikropiçte inokülasyonu sonrasında 48. saat, 72. saat, 96. saat, 120. saat ve 14. günlerde büyüteç ve konkav ayna yardımı ile görsel olarak üreme kontrolü yapılmıştır. 48. saatte üreme kontrol kuyucuğunda yeterli üreme saptanmadığı için test değerlendirilememiştir.

Çalışmamızda yer alan 40 *M. fortuitum* izolatının tümünde, 72. saatte, üreme kontrol kuyucuğunda yeterli üreme saptandığından dolayı, CLSI M24 rehberinin önerisi doğrultusunda, 72. saatte okunan MİK değerleri esas alınmıştır.

72. saat, 96. saat, 120. saat ve 14. günlerde yapılan okumalarda elde edilen MİK sonuçları Tablo 4.2.’de yer almaktadır.

Tablo 4.3.’de *M. fortuitum* izolatlarının kümülatif duyarlılık oranları, Tablo 4.4.’te MİK50 ve MİK90 değerleri yer almaktadır.

Tablo 4. 1. Klaritromisin MİK sınır değerleri ($\mu\text{g/ml}$) [153]

≤ 2	4	≥ 8
Duyarlı (S)	Orta Duyarlı (I)	Dirençli (R)

Tablo 4. 2. MİK değerleri ve indüklenebilir makrolid (iM) direnci durumu

İzolat no	Klaritromisin MİK Değerleri (µg/ml)							
	72. saat	Sonuç	96. saat	Sonuç	120. saat	Sonuç	14. gün	Sonuç
1	0,5	S	1	S	8	R	32	iM(+)
2	2	S	8	R	32	R	32	iM(+)
3	0,5	S	1	S	2	S	32	iM(+)
4	0,25	S	0,25	S	2	S	32	iM(+)
5	0,125	S	0,25	S	2	S	32	iM(+)
6	2	S	2	S	2	S	32	iM(+)
7	4	I	4	I	4	I	32	iM(-)
8	2	S	2	S	4	I	32	iM(+)
9	2	S	2	S	2	S	16	iM(+)
10	0,06	S	1	S	16	R	32	iM(+)
11	1	S	1	S	2	S	4	iM(-)
12	1	S	2	S	2	S	32	iM(+)
13	0,5	S	0,5	S	1	S	32	iM(+)
14	1	S	1	S	4	I	32	iM(+)
15	1	S	2	S	4	I	32	iM(+)
16	1	S	4	I	4	I	32	iM(+)
17	2	S	4	I	8	R	32	iM(+)
18	1	S	1	S	2	S	32	iM(+)
19	0,5	S	1	S	1	S	4	iM(-)
20	1	S	1	S	1	S	32	iM(+)
21	4	I	8	R	8	R	32	iM(-)
22	0,25	S	0,25	S	1	S	16	iM(+)
23	2	S	8	R	32	R	32	iM(+)
24	2	S	8	R	16	R	32	iM(+)
25	0,5	S	8	R	16	R	32	iM(+)
26	1	S	2	S	8	R	16	iM(+)
27	0,06	S	0,06	S	0,12	S	4	iM(-)
28	0,06	S	0,12	S	0,12	S	0,5	iM(-)
29	0,06	S	0,06	S	0,12	S	0,5	iM(-)
30	0,25	S	1	S	2	S	16	iM(+)
31	0,12	S	0,5	S	2	S	8	iM(+)
32	0,25	S	0,5	S	1	S	4	iM(-)
33	0,5	S	1	S	1	S	4	iM(-)
34	0,06	S	0,25	S	0,5	S	2	iM(-)
35	0,12	S	0,5	S	4	I	16	iM(+)
36	0,12	S	1	S	2	S	8	iM(+)
37	0,06	S	0,06	S	0,06	S	0,25	iM(-)
38	0,12	S	0,5	S	0,5	S	1	iM(-)
39	0,06	S	0,25	S	0,25	S	2	iM(-)
40	0,12	S	0,5	S	1	S	4	iM(-)

Tablo 4. 3. *M. fortuitum* izolatlarının kümülatif duyarlılık oranları

	72. saat			96. saat			120. saat		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
<i>M. fortuitum</i> (n:40)	95	5	0	80	7.5	12.5	62.5	15	22.5

S:duyarlı; I: orta duyarlı; R: dirençli

Tablo 4. 4. *M. fortuitum* izolatlarının MİK50 ve MİK90 değerleri (µg/ml)

	72. saat		96. saat		120. saat	
	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90
<i>M. fortuitum</i> (n:40)	0,5	2	1	8	2	16

M. fortuitum izolatlarının klaritromisin duyarlılık profilleri değerlendirildiğinde, 72. saatte izolatların %95'i (38/40) duyarlı (S) ve %5'i orta duyarlı (I) olarak raporlanmış olup dirençli izolat saptanmamıştır.

96. saatte yapılan okumalarda izolatların %80'i duyarlı (S), %7.5'i (3/40) orta duyarlı (I) %12.5'i (5/40) dirençli (R) olarak raporlanmıştır.

120. saatte yapılan okumalarda izolatların %62.5'i duyarlı (S), %15'i (6/40) orta duyarlı (I), %22.5'i (9/40) dirençli (R) olarak raporlanmıştır.

İzolatların inkübasyonu 14. güne uzatılarak iM direnci araştırılmıştır. 72. saatte duyarlı (MİK: ≤ 2 µg/ml) 14. günde dirençli (MİK: ≥ 8 µg/ml) saptanan izolatlar iM(+) olarak raporlanmıştır. Buna göre; izolatların %65'i (26/40) iM(+) , %35'i (14/40) iM(-) olarak raporlanmıştır.

4.2. Biyofilm Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Her izolat için hazırlanan bakteri çözeltilisi üç ayrı kuyucuğa eklenmiştir ve elde edilen üç OD değerinin (OD_1, OD_2, OD_3) ortalaması (OD_ORT) hesaplanmıştır. ODc değerinin hesaplanması için (*Negatif Kontrol_OD_ORT + 3X Negatif Kontrol OD_Standard Sapma*) formülü kullanılmıştır. Tablo 4.5.'te yer alan, Stepanovic ve arkadaşlarının önerdiği formül kullanılarak her izolatın OD_ORT değeri ODc değeri ile karşılaştırıldıktan sonra elde edilen sonuçlar biyofilm “negatif”, “zayıf biyofilm pozitif”, “orta biyofilm pozitif” ve “güçlü biyofilm pozitif” olarak yorumlanmıştır [160].

Tablo 4. 5. Biyofilm yorumlanmasında kullanılan formül [160]

Formül	Biyofilm Yorumu
$OD_ORT < ODc$	Negatif
$ODc < OD_ORT < 2ODc$	Zayıf Biyofilm Pozitif
$2ODc < OD_ORT < 4ODc$	Orta Biyofilm Pozitif
$4ODc < OD_ORT$	Güçlü Biyofilm Pozitif

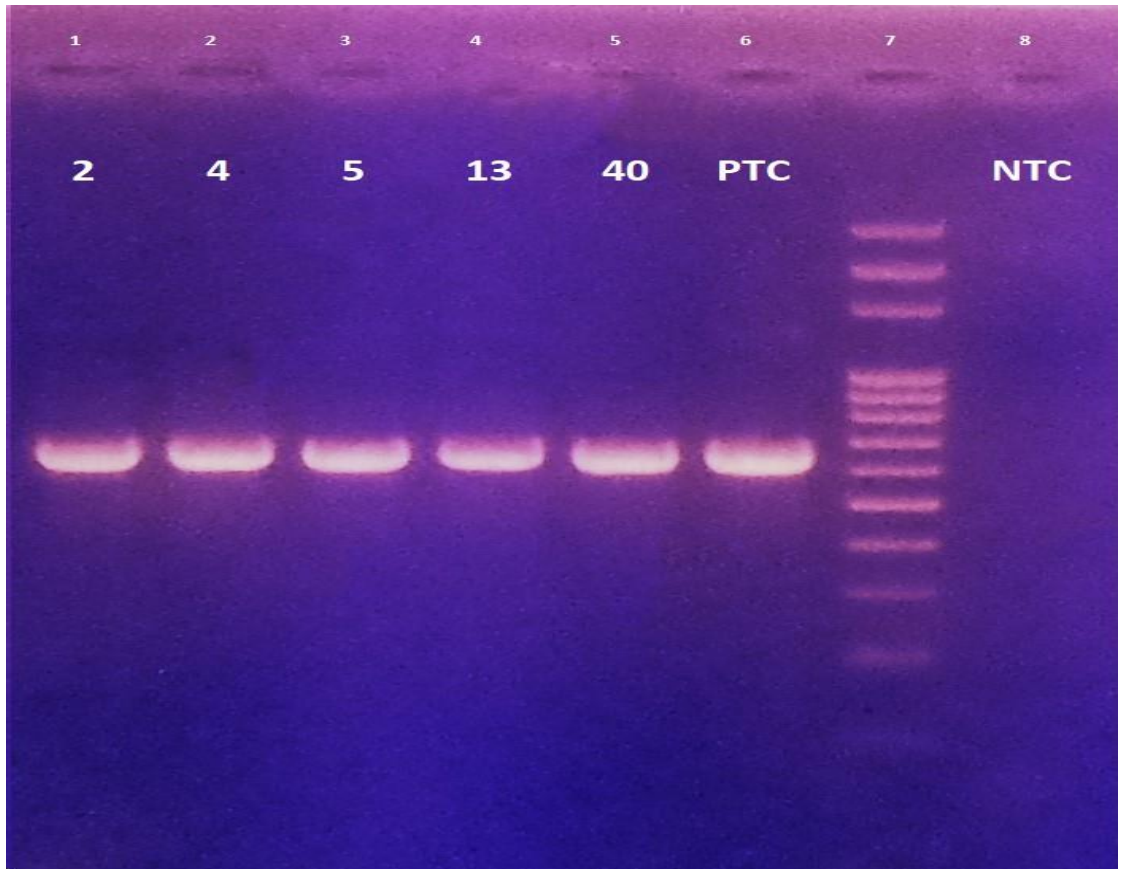
Tüm izolatlar biyofilm pozitif (%100) bulunmuştur. Bu formüle göre biyofilm negatif ve güçlü biyofilm pozitif izolat saptanmazken iki izolat (%5) “orta biyofilm pozitif”, 38 izolat (%95) “zayıf biyofilm pozitif” olarak rapor edilmiştir (Tablo 4.6)

Tablo 4. 6. Biyofilm çalışmasında elde edilen optik dansite (OD) değerleri ve yorumlanması

İzolot No	OD_1	OD_2	OD_3	OD_ORT	YORUM
1	0,06	0,05	0,05	0,05333333	ZAYIF
2	0,051	0,053	0,051	0,05166667	ZAYIF
3	0,062	0,054	0,054	0,05666667	ZAYIF
4	0,059	0,065	0,065	0,063	ZAYIF
5	0,101	0,076	0,092	0,09	ORTA
6	0,047	0,047	0,048	0,04733333	ZAYIF
7	0,043	0,055	0,056	0,05133333	ZAYIF
8	0,064	0,055	0,053	0,05733333	ZAYIF
9	0,075	0,07	0,052	0,06566667	ZAYIF
10	0,058	0,055	0,047	0,05333333	ZAYIF
11	0,051	0,051	0,051	0,051	ZAYIF
12	0,07	0,066	0,064	0,06666667	ZAYIF
13	0,089	0,107	0,076	0,09066667	ORTA
14	0,054	0,048	0,054	0,052	ZAYIF
15	0,069	0,055	0,054	0,05933333	ZAYIF
16	0,056	0,053	0,049	0,05266667	ZAYIF
17	0,053	0,066	0,054	0,05766667	ZAYIF
18	0,048	0,047	0,061	0,052	ZAYIF
19	0,048	0,049	0,048	0,04833333	ZAYIF
20	0,068	0,06	0,059	0,06233333	ZAYIF
21	0,056	0,067	0,056	0,05966667	ZAYIF
22	0,071	0,076	0,066	0,071	ZAYIF
23	0,065	0,08	0,059	0,068	ZAYIF
24	0,056	0,055	0,057	0,056	ZAYIF
25	0,05	0,057	0,051	0,05266667	ZAYIF
26	0,047	0,059	0,048	0,05133333	ZAYIF
27	0,054	0,058	0,049	0,05366667	ZAYIF
28	0,051	0,048	0,045	0,048	ZAYIF
29	0,051	0,053	0,052	0,052	ZAYIF
30	0,065	0,066	0,062	0,06433333	ZAYIF
31	0,056	0,047	0,065	0,056	ZAYIF
32	0,051	0,049	0,049	0,04966667	ZAYIF
33	0,081	0,061	0,065	0,069	ZAYIF
34	0,074	0,108	0,082	0,088	ZAYIF
35	0,047	0,055	0,05	0,05066667	ZAYIF
36	0,049	0,048	0,066	0,05433333	ZAYIF
37	0,047	0,049	0,058	0,05133333	ZAYIF
38	0,063	0,052	0,068	0,061	ZAYIF
39	0,056	0,052	0,046	0,05133333	ZAYIF
40	0,053	0,049	0,043	0,04833333	ZAYIF
Negatif Kontrol	0,043	0,043	0,044	0,04333333	
Pozitif Kontrol	0,135	0,129	0,143	0,13566667	

4.3. PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

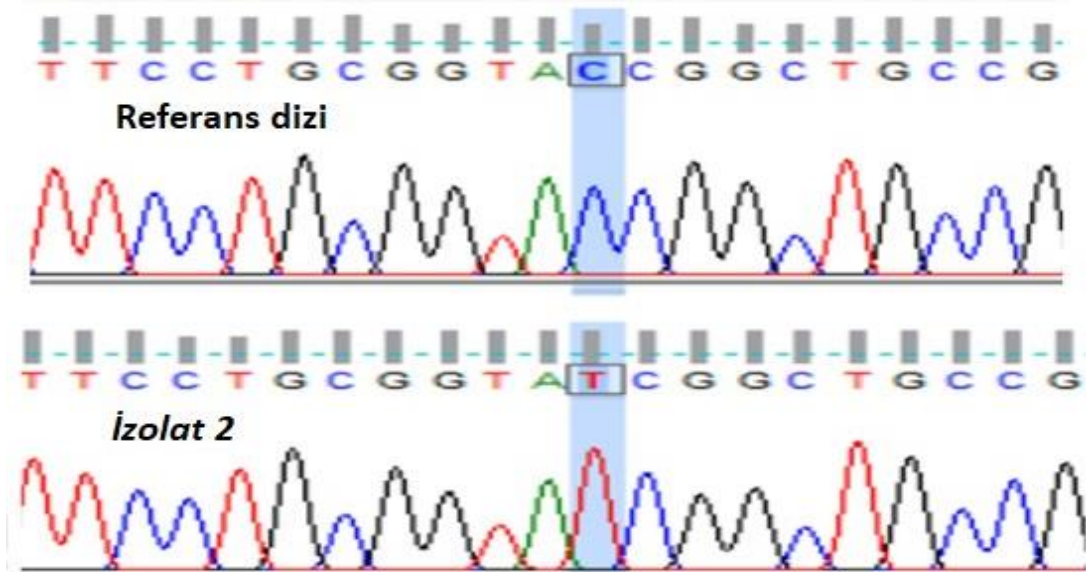
M. fortuitum izolatlarında *erm (39)* geninin varlığı PZR ile araştırılmıştır. Kırk *M. fortuitum* izolatının tamamında *erm (39)* geni saptanmıştır. Şekil 4.1.'de *M. fortuitum* izolatlarında jel elektroforezi sonrasında UV ışık altında elde edilen bant görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 4. 1. 1-5: 2-4-5-13-40 numaralı izolatların PZR ürünleri; 6: pozitif kontrol; 7: moleküler ağırlık standardı; 8: negatif kontrol

4.4. Sanger Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kırk *M. fortuitum* izolatına PZR’de saptanan *erm* (39) geninde mutasyon varlığının araştırılması amacıyla Sanger dizi analizi uygulanmıştır. Referans dizi olarak *M. fortuitum* alt tür *fortuitum* ATCC6841, DSM 46621, *erm* (39) (Gen Bankası erişim numarası: NG_047782, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) kullanılmıştır. Her izolat için elde edilen Sanger dizisi, hizalama işleminden sonra referans dizi ile karşılaştırılarak nükleotit ve amino asit değişimleri belirlenmiştir (Tablo 4.7.). Şekil 4.2.’de izolat 2’ye ait nükleotit değişimi gösterilmiştir. . Şekil 4.3.’te ise izolat 2 ve izolat 16’ya ait aminoasit değişiklikleri gösterilmiştir. Tablo 4.8 ve 4.9, sırasıyla iM(+) ve iM(-) izolatlarda saptanan nükleotit ve aminoasit değişikliklerini göstermektedir.



Şekil 4. 2. İzolat 2, 258. pozisyonda tek nükleotit değişimi (C→T) (Görüntü *FinchTv* versiyon 1.4 yazılım programından alınmıştır.)

*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
R	L	P	A	V	↓	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	S	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	P	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	P	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	P	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	P	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	P	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	P	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	↓	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	S	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	P	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	P	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	P	A	A	A	H	A	A	R	G	G	
R	L	P	A	V	P	A	A	A	H	A	A	R	G	G	

Şekil 4. 3. İzolat 2 ve izolat 16, 120. kodon prolin→ serin amino asit değişikliği
(Görüntü, MEGA versiyon 11 yazılım programından alınmıştır.)

Tablo 4. 7. İzolatların klaritromisin duyarlılık sonuçları ve saptanan nükleotit ve amino asit değişiklikleri

İzolat no	72. saat	96. saat	120. saat	14. gün	Nükleotit ve amino asit değişikliği
1	S	S	R	iM(+)	-
2	S	R	R	iM(+)	358 (C→T), 572 (T→C), 594 (G→A), 120. Kodon prolin→serin), 191. kodon (fenilalanin→serin)
3	S	S	S	iM(+)	-
4	S	S	S	iM(+)	-
5	S	S	S	iM(+)	-
6	S	S	S	iM(+)	-
7	I	I	I	iM(-)	-
8	S	S	I	iM(+)	-
9	S	S	S	iM(+)	-
10	S	S	R	iM(+)	-
11	S	S	S	iM(-)	-
12	S	S	S	iM(+)	-
13	S	S	S	iM(+)	-
14	S	S	I	iM(+)	-
15	S	S	I	iM(+)	-
16	S	I	I	iM(+)	358 (C→T)/ 120. kodon (prolin→serin), 191. kodon (fenilalanin→serin)
17	S	I	R	iM(+)	201 (G→C)
18	S	S	S	iM(+)	-
19	S	S	S	iM(-)	-
20	S	S	S	iM(+)	-
21	I	R	R	iM(-)	-
22	S	S	S	iM(+)	-
23	S	R	R	iM(+)	298 (T→G)/100. kodon (sistein→glisin)
24	S	R	R	iM(+)	-
25	S	R	R	iM(+)	-
26	S	S	R	iM(+)	-
27	S	S	S	iM(-)	201 (G→C)
28	S	S	S	iM(-)	464 (C→T), 664 (T→C), 670 (G→A), 719 (G→A)/ 155. kodon (prolin→lösin), 222. kodon (serin→prolin), 224. kodon (valin→izolösin), 240. kodon (glisin→aspartat)
29	S	S	S	iM(-)	464 (C→T), 306-307 (TG→AC), 494 (T→C), 670 (G→A), 719 (G→A)/ 155. kodon (prolin→lösin), 159. kodon (valin→aspartat), 222. kodon (serin→prolin), 224. kodon (valin→izolösin), 240. kodon (glisin→aspartat)

30	S	S	S	iM(+)	
31	S	S	S	iM(+)	455 (G→T))/ 152. kodon (arjinin→lösün)
32	S	S	S	iM(-)	
33	S	S	S	iM(-)	
34	S	S	S	iM(-)	
35	S	S	I	iM(+)	295 (C→A), 464 (C→T))/ 99. kodon (prolin→ treonin), 155. kodon (prolin→lösün)
36	S	S	S	iM(+)	
37	S	S	S	iM(-)	
38	S	S	S	iM(-)	451 (G→T))/ 151. kodon (aspartat→tirozin)
39	S	S	S	iM(-)	
40	S	S	S	iM(-)	

Tablo 4. 8. iM(+) izolatlarda saptanan nükleotit ve amino asit değişimleri

İzolat No	Nükleotit ve Amino Asit Değişimi
2	358 (C→T), 572 (T→C), 594 (G→A), 120. kodon (prolin→serin), 191. kodon (fenilalanin→serin)
16	358 (C→T)/ 120. kodon (prolin→serin), 191. kodon (fenilalanin→serin)
17	201 (G→C)
23	298 (T→G)/100. kodon (sistein→glisin)
31	455 (G→T))/ 152. kodon (arjinin→lösün)
35	295 (C→A), 464 (C→T))/ 99. kodon (prolin→ treonin), 155. kodon (prolin→lösün),

Tablo 4. 9. iM(-) izolatlarda saptanan nükleotit ve amino asit değişimi

İzolat No	Nükleotit ve Amino Asit Değişimi
27	201 (G→C)
28	464 (C→T), 664 (T→C), 670 (G→A), 719 (G→A)/ 155. kodon (prolin→lösin), 222. kodon (serin→prolin), 224. kodon (valin→izolösin), 240. kodon (glisin→aspartat)
29	464 (C→T), 306-307 (TG→AC), 494 (T→C), 670 (G→A), 719 (G→A)/ 155. kodon (prolin→lösin), 159. kodon (valin→aspartat), 222. kodon (serin→prolin), 224. kodon (valin→izolösin), 240. kodon (glisin→aspartat)
38	451 (G→T) / 151. kodon (aspartat→ tirozin)

4.5. İstatistiksel Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tablo 4. 10. Parametrelerin Dağılımları

	GeoOrt. Med. (Min.-Maks.)
MİK_72.sa	0.42 0.5- (0.06-4)
MİK_96.sa	0.93 1- (0.06-8)
MİK_120.sa	1.99 2- (0.06-32)
MİK_14.gün	11.51 32- (0.25-32)
	Ort.±SS Med. (Min.-Maks.)
OD_1	0.06±0.01 0.06- (0.04-0.1)
OD_2	0.06±0.01 0.06- (0.05-0.11)
OD_3	0.06±0.01 0.05- (0.04-0.09)
OD_ort	0.06±0.01 0.05- (0.05-0.09)

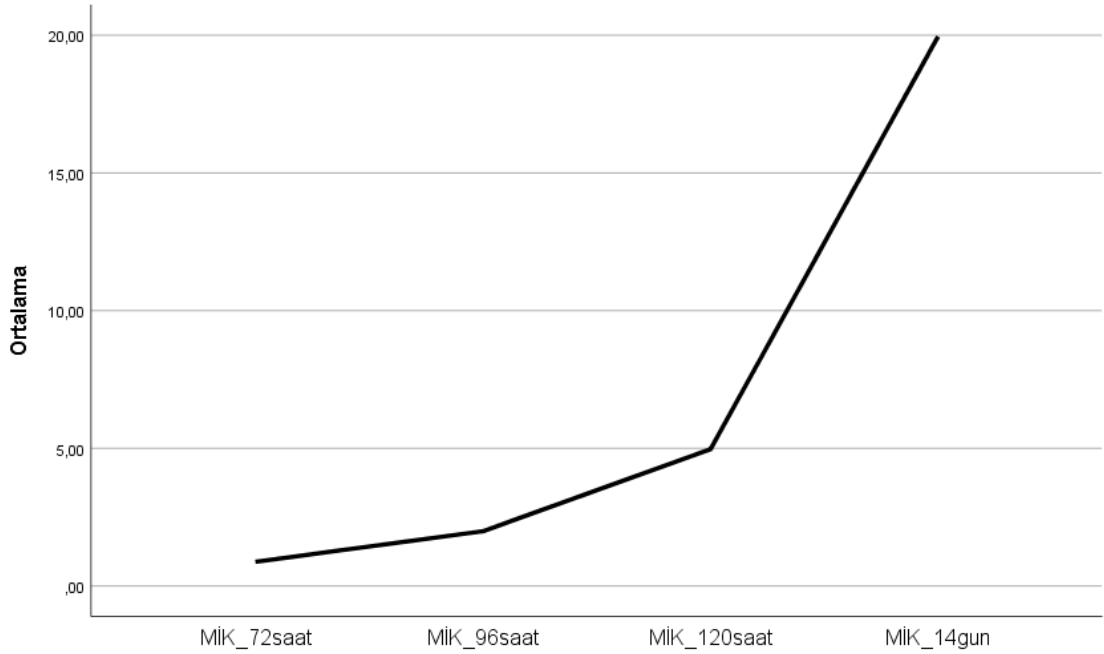
		N	%
Yorum 72. saat	I	2	5.0%
	S	38	95.0%
Yorum 96. saat	I	3	7.5%
	R	5	12.5%
	S	32	80.0%
Yorum 120. saat	I	6	15.0%
	R	9	22.5%
	S	25	62.5%
Yorum 14.gün	iM (-)	14	35.0%
	iM (+)	26	65.0%
OD_yorum	Orta	2	5.0%
	Zayıf	38	95.0%

Tablo 4. 11. Post-hoc ikili karşılaştırmalar

		72.saat-96.saat	72.saat-120.saat	96.saat-120.saat
MİK	p	<0.001	<0.001	<0.001

Wilcoxon Test

Post-hoc ikili karşılaştırmalara göre tüm ikili ölçümler arasında istatistiksel anlamlı farklılık vardır ($p < 0,008$ Bonferroni düzeltmesi). (Tablo 4.11.)



Şekil 4. 4. Farklı zamanlarda elde edilen MİK değerlerinin ortalaması (72. saat, 96. saat, 120. saat, 14. gün)

Elde edilen MİK değerlerinin ortalaması 72. saatten 14. güne doğru artış göstermektedir. (Şekil 4.4.)

Tablo 4. 12. OD ve MİK Karşılaştırmaları

	OD_ort	
	r	p
MİK_72.saat	0.095	0.561
MİK_96.saat	0.038	0.815
MİK_120.saat	0.036	0.825
MİK_14.gün	0.280	0.080

Spearman's rho korelasyon

OD ortalaması ve MİK ölçümleri arasında istatistiksel anlamlı korelasyon bulunmamıştır ($p > 0,05$). (Tablo 4.12.)

Tablo 4. 13. Farklı günlerde MİK sonuçları ile OD yorumlarının karşılaştırılması

		OD yorum				p
		Orta		Zayıf		
		N	%	N	%	
Yorum 72. saat	I	0	0.0%	2	5.3%	1.000
	S	2	100.0%	36	94.7%	
Yorum 96. saat	I	0	0.0%	3	7.9%	1.000
	R	0	0.0%	5	13.2%	
	S	2	100.0%	30	78.9%	
Yorum 120. saat	I	0	0.0%	6	15.8%	1.000
	R	0	0.0%	9	23.7%	
	S	2	100.0%	23	60.5%	
Yorum 14.gün	iM (-)	0	0.0%	14	36.8%	0.533
	iM (+)	2	100.0%	24	63.2%	

Fisher's Exact test

OD yorumları ile MİK sonuçları arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). (Tablo 4.13.)

Tablo 4. 14. Farklı zamanlardaki MİK sonuçlarının OD değerleriyle karşılaştırılması

		OD_ort	
		Ort.±SS	p
		Med. (Min.-Maks.)	
Yorum 72. Saat	I	0.06±0.01 0.06- (0.05-0.06)	0.828 ¹
	S	0.06±0.01 0.05- (0.05-0.09)	
Yorum 96. Saat	I	0.05±0 0.05- (0.05-0.06)	0.813 ²
	R	0.06±0.01 0.06- (0.05-0.07)	
	S	0.06±0.01 0.05- (0.05-0.09)	
Yorum 120. Saat	I	0.05±0 0.05- (0.05-0.06)	0.631 ²
	R	0.06±0.01 0.05- (0.05-0.07)	
	S	0.06±0.01 0.06- (0.05-0.09)	
Yorum 14.gün	iM (-)	0.055±0.01 0.05- (0.05-0.09)	0.039¹
	iM (+)	0.059±0.01 0.06- (0.05-0.09)	

Mann-Whitney U test¹, Kruskal Wallis test²

14. güne göre OD_ort dağılımı açısından istatistiksel anlamlı farklılık vardır (p<0,05). iM (+) olanların OD_ort medyan değeri daha yüksektir. (Tablo 4.14.)

5. TARTIŞMA

Hızlı üreyen TDM türlerinden biri olan *M. fortuitum*, deri enfeksiyonlarından yaygın enfeksiyonlara kadar çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. Makrolid grubu antibiyotiklerden biri olan klaritromisin, TDM türlerine bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla tercih edilmektedir [161]. TDM türlerinde in vitro antimikrobiyal duyarlılık testleri, henüz tam olarak valide edilmemiş olsa da uygun antibiyotik seçimi ve tedavinin etkinliği bakımından önemlidir. Uzun tedavi süresinin gerektiği ve yeterli klinik başarının sağlanamadığı durumlarda klinisyenler için antimikrobiyal duyarlılık profilini bilmek yol gösterici olmaktadır [162].

Bu tez çalışmasında, 40 *M. fortuitum* izolatında sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile klaritromisin duyarlılık testi çalışılmıştır. İnkübasyonu takip eden 72. , 96. ve 120. saatlerde MİK okumaları yapılmış olup dirençli izolat oranları sırasıyla %0, %12.5 ve %22.5 olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda, inkübasyonun 14. gününde MİK değerleri okunarak iM direnci varlığı araştırılmış olup izolatların %65'i iM(+) bulunmuştur.

Literatürde *M. fortuitum* izolatlarının klaritromisin duyarlılığı ile ilgili az sayıda çalışma yer almaktadır. Çalışmamızda, literatürdeki birçok çalışmadan farklı olarak inkübasyonun 72. saatindeki MİK değerlerine ek olarak 96. ve 120. saatlerindeki MİK sonuçları da kaydedilmiştir. CLSI-M24 rehberinin önerisi doğrultusunda, hızlı üreyen TDM türlerinde, MİK okumaları inkübasyonun ikinci ve beşinci günleri arasında yapılmalıdır. MİK okumalarında üreme kontrol kuyucuğunda bulanıklık ve/veya hücre çökeltisi görülmesi üreme belirtisi olarak kabul edilmelidir. Üreme kontrol kuyucuğunda yeterli üreme ise en az 2+ yoğunlukta üreme olması şeklinde tanımlanmaktadır. 48. saatte yapılan okumalarda üreme kontrol kuyucuğunda yeterli üreme olması durumunda test değerlendirmeye alınarak MİK değerleri kaydedilir. 48. saatte üreme olmaması durumunda MİK okumaları inkübasyon süresi uzatılarak 72. saatte değerlendirilmelidir. Üreme kontrol kuyucuğunda yeterli üreme saptanmaması durumunda sonuçlar inkübasyonun 96. ve 120. saatinde değerlendirilmelidir. 120. saatte üreme kontrol kuyucuğunda yeterli üreme saptanmaması durumunda testin tekrar edilmesi önerilmektedir [11].

Özellikle *M. fortuitum* türünün de içinde yer aldığı hızlı üreyen TDM'ler için MİK okumalarının, inkübasyonun 48. saatinde yapılmasının faydalı olabileceği bildirilse de bizim çalışmamızda, 48. saatte hiçbir izolatta yeterli üreme saptanmadığından değerlendirme yapılamamıştır. CLSI-M24 rehberinde MİK okumalarının, inkübasyonun ikinci ve beşinci günleri arasında, üreme kontrol kuyucuğunda üremenin saptandığı ilk günde değerlendirilmesi önerisi göz önüne alındığında, çalışmamızda yer alan tüm izolatlar için üreme kontrol kuyucuğunda en erken 72. saatte yeterli üreme saptandığından dolayı 72. saatte elde edilen MİK değerleri ve direnç oranları esas alınmıştır.

Çalışmamızda, 72. saate ek olarak inkübasyonun 96. ve 120. saatlerinde de MİK değerlerini okuyarak farklı zamanlardaki okumaların ne ölçüde değişkenlik gösterdiğini öğrenmeyi amaçladık. Bu amaçla, 72. saat, 96. saat, 120. saat MİK değerlerini kullanarak Wilcoxon testi ile yaptığımız post-hoc ikili karşılaştırmaların tümünde (72. saat-96. saat, 72. saat 120. saat, 96. saat-120 saat), istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p < 0,008$). Hızlı üreyen TDM türlerinde, klaritromisin MİK değerlerinin inkübasyonun 14. gününde, iM direncinin değerlendirilmesi amacıyla okunabileceği bildirilmektedir. [163]. Amerikan Toraks Derneği'nin verilerine göre *M. fortuitum* izolatlarının %80'i klaritromisine duyarlıdır [12].

Literatürde yer alan çalışmalarda *M. fortuitum* izolatlarında farklı klaritromisin duyarlılık oranları bildirilmiştir. *M. fortuitum* izolatlarının duyarlılık oranları, amikasin (%100), siprofloksasin (%100), imipenem (%100), klaritromisin (%80), sefoksitin (%50), doksisiklin (%50) olarak bildirilmiştir [146]. Örneğin Santos ve arkadaşlarının Brezilya'da 75 adet klinik *M. fortuitum* izolatında yapılan bir çalışmada, yüksek kinolon direnci (ofloksasin: %21.4) bulunurken izolatların tamamı (%100) trimetoprim-sülfometaksazole dirençli bulunmuştur [33, 152]. Kamada ve arkadaşlarının Japonya'da 85 adet *M. fortuitum* izolatı üzerinde yapılan bir çalışmada ise siprofloksasin direnci %94, moksifloksasin direnci %89 olarak bulunmuştur [33].

Kim ve arkadaşlarının, Güney Kore'de, 44 *M. fortuitum* izolatı ile yaptıkları bir klaritromisin mikrodilüsyon duyarlılık çalışmasında, 3. günde yapılan okumalarda, klaritromisine dirençli izolat oranı %11.3 (5/44) olarak saptanırken bizim çalışmamızda 3. günde yapılan okumalarda klaritromisine dirençli izolat

saptanmamıştır. Kim ve arkadaşları ayrıca inkübasyonun 14. gününde yaptıkları okumalarda, izolatların %87'sinde (37/44) iM pozitifliği saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise iM oranı (%65), Kim ve arkadaşlarının çalışmasından daha düşük bulunmuştur [164]. Japonya'da, 509 TDM izolatında yapılan bir çalışmada 85 *M. fortuitum* izolatının %70'i klaritromisine dirençli olarak bildirilmiş olup bu direnç oranı bizim çalışmamızdaki direnç oranlarından daha yüksektir. Bu çalışmada, 3. , 4. ve 5. günlerde yapılan okumalar erken okuma zamanı olarak tanımlanmış olup geç okuma zamanı olarak tanımlanan 14. günde yapılan okumalarda iM oranı %99 olarak oldukça yüksek rapor edilmiştir [33]. Japonya'dan bildirilen başka bir çalışmada ise, Hatakeyama ve arkadaşları, TDM türlerinden 9 *M. fortuitum*, 13 *M. abscessus* ve 12 *M. chelonae*'nin klaritromisin duyarlılıklarını sırasıyla %0, %62 ve %100 olarak bildirmişlerdir [165]. Aono ve arkadaşlarının Japonya'da yaptıkları bir çalışmada, 43 *M. fortuitum* izolatının tamamı (%100) klaritromisine dirençli raporlanmıştır [166]. Hatakeyama ve arkadaşlarının çalışmasıyla Kamada ve arkadaşlarının çalışmaları Japonya'daki *M. fortuitum* izolatlarının çok yüksek oranlarda klaritromisin direncine sahip olduğunu göstermektedir [33, 165]. Çin'den bildirilen, 17 *M. fortuitum* izolatının dahil edildiği bir çalışmada, izolatların %94'ü (16/17) klaritromisine dirençli saptanmıştır. Fu ve arkadaşlarının Çin'de yaptıkları bir çalışmada, 3. günde yapılan okumalarda, 9 *M. fortuitum* izolatının 7'sinde (%77.8) klaritromisin direnci saptanmıştır [167]. Çin'den bildirilen başka bir çalışmada ise Zhang ve arkadaşları, 51 *M. fortuitum* izolatının %76.5'ini (39/51) klaritromisine dirençli olarak saptamışlardır [168]. Kore'de, Lee ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 55 *M. fortuitum* izolatı için 3. günde yapılan MİK okumalarında klaritromisin duyarlılık oranları %84 duyarlı , %9 orta duyarlı , %7 dirençli olarak bulunmuştur [169]. Bu çalışmada *M. fortuitum* izolatlarının klaritromisin direnç oranı çalışmamızla benzerlik göstermektedir [33, 167, 169]. Hershko ve arkadaşlarının İsrail'de yaptıkları bir çalışmada, klaritromisinin hızlı üreyen TDM türlerindeki antimikrobiyal etkinliğinin amikasin ve linezolide kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, hızlı üreyen TDM türlerinden *M. fortuitum*, *M. abscessus* ve *M. chelonae*'nin klaritromisin duyarlılıkları sırasıyla %28, %39 ve %94 olarak bildirilmiş olup klaritromisine en az duyarlı TDM türü *M. fortuitum* olarak öne çıkmaktadır [170]. Endonezya'da, 48 *M. fortuitum* izolatı

üzerinde yapılan bir çalışmada, izolatların %18.8'i "duyarlı", %81.2'si "duyarlı olmayan" şeklinde rapor edilmiştir. Bu çalışmadaki direnç oranları bizim çalışmamızdan daha yüksek olup MİK okumalarının sadece yedinci günde yapılması ve katyon ayarlı Mueller-Hinton besiyeri yerine Middlebrook 7H9 kullanılması yönüyle yöntemsel farklılıklar bulunmaktadır [171]. İspanya'da, Esteban ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise klaritromisine duyarlı *M. fortuitum* izolatlarının oranı %52.8 olarak bildirilmiştir [172]. Türkiye'de, Özkarataş ve arkadaşlarının, 35 *M. fortuitum* izolatında, erken değerlendirme zamanı (3.-5. günler) ve geç değerlendirme zamanı (14. gün) olarak iki farklı zamanda değerlendirme yaptıkları klaritromisin duyarlılık çalışmasında; erken değerlendirme zamanında izolatların %50'si orta duyarlı olarak bildirilirken %32.35'i duyarlı, %17.65'i ise dirençli olarak bulunmuştur [173]. Literatürdeki verilere göre TDM türleri içerisinde klaritromisin duyarlılığı açısından karşılaştırma yapıldığında, *M. fortuitum* türünün; *M. abscessus* ve *M. chelonae*'ye göre daha düşük duyarlılığa sahip olduğunu bildiren çalışmalar vardır [33, 165, 174]. Ancak hızlı üreyen TDM türleri içerisinde genel duyarlılık profili bakımından, *M. fortuitum*'un *M. abscessus* ve *M. chelonae*'ye göre daha az dirençli bir tür olduğu kabul edilmektedir [174]. Çavusoglu ve arkadaşları tarafından 25 adet hızlı üreyen TDM türünde yapılan duyarlılık çalışmasında, *M. fortuitum* izolatlarının %83.3'ü (5/6) klaritromisine duyarlı bulunmuştur. Bu oran, bizim çalışmamızda bildirilen 96. saatteki duyarlı izolat oranı (%80) ile benzerlik göstermektedir. Hindistan'dan bildirilen bir çalışmada, 30 *M. fortuitum* izolatının tamamı (%100) klaritromisine duyarlı bulunmuştur [161]. Dünyanın farklı bölgelerinden farklı direnç oranlarının bildirilmesi, *M. fortuitum* izolatlarının klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde coğrafik dağılımın önemli bir faktör olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamız, Türkiye'deki *M. fortuitum* izolatlarının güncel klaritromisin duyarlılık profili verilerine katkı sağlaması bakımından literatüre önemli bilgiler kazandırdığını düşünüyoruz.

Mikobakterilerin, çeşitli yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturabildikleri ve duyarlı konakta enfeksiyona yol açabildikleri gösterilmiştir. Biyofilm oluşturan mikobakterilerden biri olan *M. fortuitum*'un, özellikle su kaynaklarında ve tıbbi cihazlarda kolonize olabildiği ve antibiyotiklere dirençli ciddi enfeksiyonlara neden

olabildiği bildirilmiştir [175]. Nazokomiyal enfeksiyonların yaklaşık olarak %80'i biyofilm oluşturabilen bakterilerle ilişkilendirilmektedir [176]. *M. fortuitum*'un biyofilm oluşumu ile ilgili literatürde çok az sayıda kaynak yer almaktadır. Mikobakteriyel biyofilmlerin daha yüksek düzeyde antibiyotik direncine sahip oldukları bildirilmiştir [113, 155]. *M. fortuitum* enfeksiyonlarında biyofilm oluşumunun önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir. Biyofilmin hastane ortamlarından uzaklaştırılması oldukça güç olduğundan, *M. fortuitum*, hastane ortamından eradike edilmesi oldukça zor bir ajan olarak tanımlanmıştır [176]. Dolayısıyla, *M. fortuitum*'da biyofilm oluşumu ile ilişkili etmenlerin tanımlanması ve biyofilm oluşumunu önleyici stratejilerin geliştirilmesi, biyofilm enfeksiyonlarıyla daha etkin mücadele edilmesini sağlayacaktır [155].

Bizim çalışmamızda, biyofilm oluşumu test edilen 40 *M. fortuitum* izolatu içerisinde iki izolat "orta biyofilm pozitif", diğer izolatlar ise "zayıf biyofilm pozitif" olarak saptanmıştır ve klaritromisin duyarlılığı ile biyofilm oluşumu arasında hipotezimizde yer alan negatif korelasyon saptanamamıştır. Ancak, klaritromisin direncinde esas olarak dikkate alınması gereken, yüksek biyofilm pozitifliğidir. Çalışmamızda, yüksek biyofilm pozitif izolat saptanmamıştır. Biyofilm oluşumunun test edilmesi amacıyla 96 kuyucuklu, polistren, düz tabanlı mikropklaklar kullanılmıştır. Polistren yapıda mikropklak kullanılmasının nedeni ucuz ve hidrofobik olmasıdır [177]. Biyofilm oluşumunun uyarılmasını sağlamak amacıyla biyofilm besiyeri olarak seçilen Middlebrook 7H9 besiyerine Tween-80 eklenmiştir [155]. Sharma ve arkadaşları, Tween-80'nin, mikobakterilerin biyofilm oluşumunda uyarıcı bir etkiye sahip olduğunu bildirirlerken bunun aksine Xiang ve arkadaşları, Tween-80'nin mikobakteriyel biyofilmler üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir [155, 178]. Bizim çalışmamızda biyofilm oluşumunun test edilmesi için ekim yapılan mikropklak, 35°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Hızlı üreyen TDM türlerinde biyofilm testinin, 30°C, 35°C ve 37°C olarak farklı sıcaklıklarda yapılabileceği bildirilmiştir [175, 179, 180]. Çalışmamızda biyofilm oluşumu dinamik koşullarda gerçekleştirilmiş olup, biyofilm oluşumunun uyarılması amacıyla mikropklak, ısıtıcı çalkalayıcı ile çalkalanmıştır. Biyofilm testiyle yapılan çalışmalarda, çalışmacılardan bazıları statik yöntemi tercih ederken bazıları dinamik

yöntemi kullanmışlardır [155, 181]. Sharma ve arkadaşları, *M. fortuitum*'un, inkübasyonun 4. gününde biyofilmin maksimum düzeye ulaştığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, Sharma ve arkadaşlarının önerisi doğrultusunda biyofilm okumaları inkübasyonun 4. gününde gerçekleştirilmiştir. Sharma ve arkadaşlarının çalışmalarından farklı olarak, çalışmamızda inkübasyonun farklı günlerinde biyofilm oluşumu değerlendirilmemiştir [155]. Sharma ve arkadaşları ve Merritt ve arkadaşları, inkübasyonunun 5. gününde biyofilm miktarındaki azalmayı, besiyerindeki besin miktarının azalması ile ilişkilendirmişlerdir [155, 182]. Sousa ve arkadaşlarının kristal viyole yöntemini kullanarak hızlı üreyen TDM türlerinden *M. fortuitum*, *M. smegmatis* ve *M. chelonae* üzerinde yaptıkları biyofilm çalışmasında, Sharma ve arkadaşlarının çalışmasının aksine 5. günde oluşan biyofilm miktarını 4. günde oluşan biyofilm miktarından daha yüksek bulmuşlardır [109, 155]. Yöntemsel farklılıklara bakıldığında, Sharma ve arkadaşları, biyofilm testinde Tween-80 eklenmiş Middlebrook 7H9 besiyeri kullanırken Sousa ve arkadaşları Mueller Hinton besiyerini kullanmışlardır. Ayrıca, Sousa ve arkadaşları, inokulum hazırlanması aşamasında seyreltici olarak %0.9 salin solüsyonu kullanırken Sharma ve arkadaşları ise seyreltici olarak Middlebrook 7H9 besiyerini kullanmışlardır [109, 155]. Bu iki çalışmada kullanılan besiyerlerinin içeriğinin ve seyrelticilerin iyon içeriğinin farklı olması farklı sonuçlara yol açmış olabilir. Saptawati ve arkadaşlarının Endonezya'da yaptıkları bir çalışmada, biyofilm oluşumu test edilen 48 *M. fortuitum* izolatının %43.8 (21/48)'inin biyofilm oluşturduğu, biyofilm oluşturan izolatların %90.5'inin, biyofilm oluşturmayan izolatların ise %74.1'inin klaritromisine duyarlı olmadığı bildirilmiştir ve biyofilm üreten izolatların klaritromisin duyarlılığının daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır [171]. Bizim çalışmamızda, biyofilm oluşturan izolat oranı, Saptawati ve arkadaşlarının çalışmasından yüksek olsa da esas değerlendirilmesi gereken güçlü biyofilm oluşturan izolatların oranıdır. Saptawati ve arkadaşlarının çalışmasında bizim çalışmamızdan farklı olarak biyofilm oluşturan izolatların %42.9'unun (9/21) güçlü biyofilm oluşturdukları bildirilmiştir [171]. Saptawati ve arkadaşları, biyofilm oluşturma ve klaritromisin direnci arasında korelasyon saptarken bizim çalışmamızda saptanmamıştır [171]. Bardouniotis ve arkadaşlarının, Calgari'nin önerdiği çıkıntılı mikropalak yöntemini kullanarak yaptıkları biyofilm çalışmasında, *M. fortuitum*

izolatlarının 14 günlük izlemde, biyofilm oluşumunun sigmoidal artış gösterdiği, diğer çalışmalardan farklı olarak üçüncü günden dördüncü güne geçerken biyofilm oluşumunda hafif bir azalma saptandığı bildirilmiştir [183]. Biyofilm oluşumunun, inkübasyonu takip eden ardışık günlerde değerlendirilmeyip sadece dördüncü günde değerlendirilmesi, bu çalışmanın kısıtlılıklarından biri olarak değerlendirilebilir.

M. fortuitum genomu, 6,349,738 bp uzunluğundadır ve diğer mikobakterilerde olduğu gibi GC içeriği (%66) açısından zengindir [184]. *erm* (39) geni, kromozomun 1,817,406-1,818,146 bp arasında yer almaktadır [185]. Makrolidler, TDM türlerine bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılan kritik role sahip antibiyotiklerdir. 23SrRNA'daki nokta mutasyonlar yapısal makrolid direnci ile ilişkilendirilirken kromozomal olarak yerleşen 23SrRNA metilaz genleri (*erm*) iM ile ilişkilendirilmiştir [186]. *erm* geni, indüklenebilir makrolid-linkozamid-streptogramin B direncine neden olurken mikobakterilerde farklı olarak *erm* geninin streptograminleri etkilemediği, dolayısıyla iML direncine neden olduğu bildirilmiştir [148]. Bu durum, streptograminlerin, *erm* geninin 23SrRNA'da metil grubu bağlandığı adenin nükleotid pozisyonundan farklı bir noktaya bağlanması ve bu şekilde *erm* geninden etkilenmemesi ile açıklanmaktadır [148]. *M. fortuitum*'da kromozomal olarak yerleşen *erm* (39) geni, iML ile ilişkili gendir [186]. *erm* geninin varlığı, hızlı üreyen TDM türlerinin tedavisinde makrolid grubu antibiyotiklerin tercih edilmesinde belirleyici role sahiptir. *erm* geninde mutasyon varlığı makrolidlerle yapılan tedavinin başarısını etkilemektedir. *erm* geni, *M. abscessus*'ta da gösterilmiştir. *M. abscessus*'ta *erm* (41) geninin indüklenebilir makrolid direncine neden olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda, izolatların tamamı (%100) PZR ile *erm* (39) pozitif olarak bulunmuştur. Sanger dizi analizi ile hem iM (+) hem de iM (-) izolatlarda *erm* (39) geninde nükleotit değişiklikleri saptanmıştır. Bu nükleotit değişikliklerinin bazıları aminoasit değişikliğine yol açarken bazılarında sessiz kalmıştır. İzolat 2-izolat 16 ve izolat 28-izolat 29 benzer nükleotit ve amino asit değişikliklerine sahip olduğundan dolayı filogenetik olarak *M. fortuitum*'un aynı ya da benzer alt türüne ait olduğu düşünülebilir. Hashemzadeh ve arkadaşlarının İran'da yaptıkları bir çalışmada, 49 *M. fortuitum* izolatında *erm* (39) geninde mutasyon varlığı araştırılmış ve izolatların %55.55'inde 124. pozisyonda A→G, %14.81'inde 135. pozisyonda C→A,

%29.62'sinde 275. pozisyonda G→T mutasyonları olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın verilerini bizim çalışmamızla karşılaştırdığımızda; bizim çalışmamızda bu mutasyonlar saptanmamıştır [187]. Hashemzadeh ve arkadaşları bu çalışmada mutasyon olarak bildirdikleri nükleotit değişimlerinin amino asit sentezi üzerinde değişiklik meydana getirip getirmediği konusunda herhangi bir yorumda bulunmamışlardır [187]. Nash ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada bizim çalışmamızla benzer şekilde 32 *M. fortuitum* izolatının tamamında PZR'de *erm (39)* geni saptanmıştır [148]. Bu çalışmada, klaritromisin duyarlı izolatlarda *erm (39)* geninde başlangıç noktasından 58 bç uzakta GTG→CTG mutasyonunun baskın olduğu saptanmıştır ve bu mutasyon *erm (39)* geninde fonksiyon kaybı ile ilişkilendirilmiştir. Fu ve arkadaşlarının 9 *M. fortuitum* izolatı ile yaptıkları bir çalışmada da izolatların tamamında (%100) *erm (39)* geni pozitif bulunmuştur. Ancak, bu çalışmada, *erm (39)* geninde mutasyon varlığı araştırılmamıştır [167]. İspanya'da, Esteban ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PZR ile *erm(39)* geni, bizim çalışmamızdan farklı olarak *M. fortuitum* izolatlarının %84.3'ünde pozitif bulunmuştur [172]. Bu çalışmada *erm (39)* geninin pozitiflik oranının bizim çalışmamızdan daha düşük saptanmasının olası sebepleri arasında; coğrafik suş farklılıkları, laboratuvar işlemleri esnasında gen kayıpları, ısı etkisine maruz kalma ve seçilen primer dizisiyle ilgili özgüllülük problemleri sayılabilir [172, 188, 189]. Ayrıca Esteban ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada, TDM türlerinde, *erm* geni varlığının yüksek eritromisin MİK değerleri ile (yüksek klaritromisin MİK değerleri ile karşılaştırıldığında) daha yüksek korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir [172]. Aono ve arkadaşlarının Japonya'da yaptıkları bir çalışmada, tamamı (%100) klaritromisine konstitüsyonel dirençli bulunan 43 *M. fortuitum* izolatında *erm (39)* geninde mutasyon saptanmamıştır [166]. Bu durum, *erm (39)* geninin iM ile ilişkili olduğu, konstitüsyonel dirence neden olmaması ile açıklanmıştır. Saw ve arkadaşlarının Malezya'da, 13 *M. fortuitum* izolatı üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde PZR'de *erm (39)* genini tüm izolatlarda pozitif olarak raporlamışlardır. Bu çalışmada *erm (39)* geninin 191 bç'lik bir bölgesi hedef alınırken bizim çalışmamızda bu genin 649 bç'lik daha uzun bir bölümü hedef alınmıştır [190].

Çalışmamız, Türkiye’de, bulabildiğimiz kadarıyla, *M. fortuitum* izolatlarında *erm (39)* genindeki mutasyonların ele alındığı ilk çalışmadır. Literatürde *M. fortuitum*’un *erm (39)* genindeki mutasyonlarla ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Çalışmamızın, literatürde, *erm (39)* geninde saptadığımız nükleotit ve amino asit değişiklikleri bakımından en kapsamlı çalışmalardan biri olduğunu düşünüyoruz. Çalışmamızda saptamış olduğumuz mutasyonların iM ile ilişkisinin daha iyi irdelenebilmesi için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde, tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) neden olduğu enfeksiyonların sayısında önemli bir artış görülmektedir. Bu durum, literatürde, mikobakteri türleri içerisinde, TDM türlerinin daha kapsamlı olarak ele alınmasını gerekli kılmıştır. Hızlı üreyen TDM türlerinden biri olan *M. fortuitum*, deri enfeksiyonlarından sistemik enfeksiyonlara kadar farklı klinik tablolara yol açmakta olup enfeksiyonun şiddeti esas olarak duyarlı konağın immün sistemi ile ilgilidir. Çalışmamızda, 40 adet *M. fortuitum* izolatında klaritromisin duyarlılık testi çalışılmış olup 72. saatte yapılan değerlendirmede dirençli izolat saptanmazken, 14. günde yapılan değerlendirmede izolatların %65'inde iM direnci pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlar, *M. fortuitum* tedavisinde, tedavi sırasında indüklenebilir makrolid direnci gelişmesinin söz konusu olabileceğini ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz sonuçları başta enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji uzmanları olarak klinisyenlerle paylaşmayı ve *M. fortuitum* enfeksiyonlarında makrolid tedavisi esnasında indüklenebilir direnç gelişimi açısından dikkatli olmaları konusunda fikir alışverişinde bulunmayı hedeflemekteyiz. Çalışmamızda, biyofilm oluşumu ile makrolid direnci arasında anlamlı bir ilişki saptanmamış olup, bu konuda daha fazla çalışmaya gereksinim vardır. Çalışmamızda, Sanger dizi analizi ile 10 farklı izolatta, farklı pozisyonlarda nükleotit ve/veya amino asit değişiklikleri saptanmıştır. Bu suşların özellikle tüm genom analizleri ile gen haritasının ortaya konulması, yeni suşların ve/veya alt türlerin keşfedilmesine ve makrolid direnci ile ilişkisinin daha iyi irdelenmesine katkıda bulunacaktır. Literatürde, *M. fortuitum*'da klaritromisin duyarlılığı ve biyofilm ile ilgili çalışmalar az sayıda olup bu konuda daha fazla çalışmaya gereksinim vardır. Özellikle coğrafik olarak duyarlılık profillerinin farklılık göstermesi, her ülkenin kendi duyarlılık profillerini ortaya koymasını gerekli kılmaktadır. Bu şekilde, *M. fortuitum* enfeksiyonlarında daha etkili tedavi rejimleri belirlenebilecektir. Ülkemizde de *M. fortuitum* ile ilgili literatürde az sayıda çalışma yer almakta olup çalışmamız literatürdeki bu boşluğu doldurmaktadır. Daha fazla sayıda izolatın dahil edilerek özellikle çok merkezli çalışmaların yürütülmesi, *M. fortuitum* enfeksiyonlarının tedavisinde daha akılcı ve bilimsel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ışık tutacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Organization, W.H., *World Health Organization Global Tuberculosis Report 2021*. URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tbreports/global-tuberculosis-report-2021>, 2021.
2. Sandhu, G.K., *Tuberculosis: current situation, challenges and overview of its control programs in India*. Journal of global infectious diseases, 2011. **3**(2): p. 143.
3. Dye, C., et al., *Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country*. Jama, 1999. **282**(7): p. 677-686.
4. Potter, B., K. Rindfleisch, and C.K. Kraus, *Management of active tuberculosis*. American Family Physician, 2005. **72**(11): p. 2225-2232.
5. Rastogi, N., E. Legrand, and C. Sola, *The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis*. Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties, 2001. **20**(1): p. 21-54.
6. Khosravi, A.D., et al., *Differential identification of mycobacterial species using high-resolution melting analysis*. Frontiers in Microbiology, 2017. **8**: p. 2045.
7. Brown-Elliott, B.A. and J.V. Philley, *Rapidly growing mycobacteria*. Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections, 2017: p. 703-723.
8. Gangadharam, P.R. and P.A. Jenkins, *Mycobacteria: I basic aspects*. Vol. 1. 1997: Springer Science & Business Media.
9. Kahana, L.M., et al., *Mycobacterium avium complex infection in an immunocompetent young adult related to hot tub exposure*. Chest, 1997. **111**(1): p. 242-245.
10. Griffith, D.E., *Nontuberculous mycobacterial disease: A comprehensive approach to diagnosis and management*. 2018: Springer.
11. *CLSI. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and other Aerobic Actinomycetes. 3rd ed. CLSI standart M24*. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
12. Griffith, D.E., et al., *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2007. **175**(4): p. 367-416.
13. *Centers for Disease Control and Prevention, Healthcare-Associated Infections (HAI-s), Diseases and Organisms, Nontuberculous, Mycobacteria (NTM) Infections*. 2019, <https://www.cdc.gov/hai/organisms/nontuberculous-mycobacteria.html#:~:text=Although%20anyone%20can%20get%20an,transmitted%20person%2Dto%2Dperson>.
14. Daniel, T.M., J.H. Bates, and K.A. Downes, *History of tuberculosis*. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control, 1994: p. 13-24.
15. *T.C. Sağlık Bakanlığı Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi*. Vol. 2. Baskı. 2019, Ankara: Artı6 Medya Tanıtım Matbaa Ltd. Şti.
16. Barış, Y.İ., *Tüberküloz Tarihi*. 2010, Klinik Gelişim Dergisi. p. 56-59.
17. Roberts, C.A. and J.E. Buikstra, *The bioarchaeology of tuberculosis: a global perspective on a re-emerging disease*. 2003: University Press of Florida.

18. Pezzella, A.T., *History of pulmonary tuberculosis*. Thoracic surgery clinics, 2019. **29**(1): p. 1-17.
19. Johnson, M.M. and J.A. Odell, *Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections*. Journal of thoracic disease, 2014. **6**(3): p. 210.
20. Heifets, L. *Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria*. in *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2004. Copyright© 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ...
21. Brown, T.H., *The rapidly growing mycobacteria—Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae*. Infection Control & Hospital Epidemiology, 1985. **6**(7): p. 283-288.
22. Pattyn, S., et al., *A study of Mycobacterium fortuitum (ranae)*. Journal of Medical Microbiology, 1974. **7**(1): p. 67-76.
23. Muthusami, J.C., et al., *Mycobacterium fortuitum: an iatrogenic cause of soft tissue infection in surgery*. ANZ journal of surgery, 2004. **74**(8): p. 662-666.
24. Percival, S.L. and D.W. Williams, *Mycobacterium*, in *Microbiology of waterborne diseases*. 2014, Elsevier. p. 177-207.
25. Iseman, M.D., *Klinisyenler İçin Tüberküloz Kılavuzu*. 2002, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
26. Gupta, R.S., B. Lo, and J. Son, *Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus Mycobacterium into an emended genus Mycobacterium and four novel genera*. Frontiers in microbiology, 2018. **9**: p. 67.
27. Meehan, C.J., et al., *Reconstituting the genus Mycobacterium*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2021. **71**(9).
28. Qin, Q.-L., et al., *A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights*. Journal of bacteriology, 2014. **196**(12): p. 2210-2215.
29. van Ingen, J., et al., *Characterization of Mycobacterium orygis as M. tuberculosis complex subspecies*. Emerging infectious diseases, 2012. **18**(4): p. 653.
30. Patterson, S., et al., *Social and environmental factors affect tuberculosis related mortality in wild meerkats*. Journal of Animal Ecology, 2017. **86**(3): p. 442-450.
31. Ratnatunga, C.N., et al., *The rise of non-tuberculosis mycobacterial lung disease*. Frontiers in immunology, 2020. **11**: p. 303.
32. Bilgehan, H., *Mycobacteriaceae*, in *Enfeksiyon Hastalıkları*. 1992, Barış Yayıncılık Fakülteler Kitabevi: İzmir. p. 341-78.
33. Kamada, K., et al., *Nationwide surveillance of antimicrobial susceptibility of 509 rapidly growing mycobacteria strains isolated from clinical specimens in Japan*. Scientific reports, 2021. **11**(1): p. 12208.
34. Falkinham, J.O., *Environmental sources of nontuberculous mycobacteria*. Clinics in chest medicine, 2015. **36**(1): p. 35-41.
35. Dahl, V.N., et al., *Global trends of pulmonary infections with nontuberculous mycobacteria: a systematic review*. International Journal of Infectious Diseases, 2022. **125**: p. 120-131.
36. Stahl, D.A. and J. Urbance, *The division between fast-and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria*. Journal of bacteriology, 1990. **172**(1): p. 116-124.

37. Gedikoğlu, S., *Mycobacterium*, *Klinik Mikrobiyoloji*. 1994, Güney Nobel Kitabevleri: Bursa. p. 65-82.
38. Riedel, S., *Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology* 28 ed. 2019: McGraw-Hill Education.
39. Murray, P.R., *Medical Microbiology*. 7 ed. 2013, ABD: Mosby Elsevier.
40. Kocabaş, A., *Akciğer Tüberkülozu*, in *Enfeksiyon Hastalıkları*. 1996, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti.: Ankara. p. 396-448.
41. Sastry, A.S. and S. Bhat, *Essentials of medical microbiology*. 2018: JP Medical Ltd.
42. Chatterjee, D., *The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action*. *Current opinion in chemical biology*, 1997. **1**(4): p. 579-588.
43. Kolattukudy, P., et al., *Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria*. *Molecular microbiology*, 1997. **24**(2): p. 263-270.
44. Liu, J., et al., *Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(47): p. 29545-29551.
45. Jackson, M., *The mycobacterial cell envelope—lipids*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2014. **4**(10).
46. Hunter, R.L., et al., *Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitory tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2006. **36**(4): p. 371-386.
47. Asano, M., A. Nakane, and T. Minagawa, *Endogenous gamma interferon is essential in granuloma formation induced by glycolipid-containing mycolic acid in mice*. *Infection and immunity*, 1993. **61**(7): p. 2872-2878.
48. Köksal, F. and A. Yaman, *Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvar yapısı*. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu*, Samsun, Sempozyum Kitabı, 2003: p. 34-47.
49. Guérardel, Y., et al., *Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of Mycobacterium kansasii: novel structural features and apoptosis-inducing properties*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(38): p. 36637-36651.
50. Jarlier, V. and H. Nikaido, *Permeability barrier to hydrophilic solutes in Mycobacterium chelonae*. *Journal of bacteriology*, 1990. **172**(3): p. 1418-1423.
51. Trias, J., V. Jarlier, and R. Benz, *Porins in the cell wall of mycobacteria*. *Science*, 1992. **258**(5087): p. 1479-1481.
52. Özkara, Ş. and Z. Kılıçaslan, *Tüberküloz*. 2010, İstanbul Toraks Kitapları: İstanbul.
53. Echeverria-Valencia, G., S. Flores-Villalva, and C.I. Espitia, *Virulence factors and pathogenicity of Mycobacterium*. *Mycobacterium-Research and Development*. InTech, 2018: p. 231-255.
54. Ramon-Luing, L.A., et al., *Virulence Factors of Mycobacterium tuberculosis as Modulators of Cell Death Mechanisms*. *Pathogens*, 2023. **12**(6): p. 839.
55. Coscolla, M. and S. Gagneux. *Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis*. in *Seminars in immunology*. 2014. Elsevier.

56. Torrelles, J.B., A.K. Azad, and L.S. Schlesinger, *Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from Mycobacterium tuberculosis by C-type lectin pattern recognition receptors*. The Journal of immunology, 2006. **177**(3): p. 1805-1816.
57. Court, N., et al., *Mycobacterial PIMs inhibit host inflammatory responses through CD14-dependent and CD14-independent mechanisms*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24631.
58. Cambier, C., et al., *Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids*. Nature, 2014. **505**(7482): p. 218-222.
59. Madigan, C.A., et al., *A macrophage response to Mycobacterium leprae phenolic glycolipid initiates nerve damage in leprosy*. Cell, 2017. **170**(5): p. 973-985. e10.
60. Forrellad, M.A., et al., *Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex*. Virulence, 2013. **4**(1): p. 3-66.
61. Master, S., et al., *Mapping of Mycobacterium tuberculosis katG promoters and their differential expression in infected macrophages*. Journal of bacteriology, 2001. **183**(13): p. 4033-4039.
62. Moehring, J.M. and M.R. Solotorovsky, *Relationship of colonial morphology to virulence for chickens of Mycobacterium avium and the nonphotochromogens*. American Review of Respiratory Disease, 1965. **92**(5): p. 704-713.
63. Da Silva, T.R.M., et al., *Virulent Mycobacterium fortuitum restricts NO production by a gamma interferon-activated J774 cell line and phagosome-lysosome fusion*. Infection and immunity, 2002. **70**(10): p. 5628-5634.
64. Dheda, K., et al., *The immunology of tuberculosis: from bench to bedside*. Respiriology, 2010. **15**(3): p. 433-450.
65. Ernst, J.D., *The immunological life cycle of tuberculosis*. Nature Reviews Immunology, 2012. **12**(8): p. 581-591.
66. Davis, J.M. and L. Ramakrishnan, *The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection*. Cell, 2009. **136**(1): p. 37-49.
67. To, K., et al., *General overview of nontuberculous mycobacteria opportunistic pathogens: Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus*. Journal of clinical medicine, 2020. **9**(8): p. 2541.
68. Sousa, S., et al., *Nontuberculous mycobacteria persistence in a cell model mimicking alveolar macrophages*. Microorganisms, 2019. **7**(5): p. 113.
69. Kim, B.-R., et al., *Phagosome escape of rough Mycobacterium abscessus strains in murine macrophage via phagosomal rupture can lead to type I interferon production and their cell-to-cell spread*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**: p. 125.
70. Rosain, J., et al., *Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014–2018 update*. Immunology and cell biology, 2019. **97**(4): p. 360-367.
71. Egen, J.G., et al., *Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas*. Immunity, 2008. **28**(2): p. 271-284.

72. Shu, C.-C., et al., *Host immune response against environmental nontuberculous mycobacteria and the risk populations of nontuberculous mycobacterial lung disease*. Journal of the Formosan Medical Association, 2020. **119**: p. S13-S22.
73. Donohue, M.J. and L. Wymer, *Increasing prevalence rate of nontuberculous mycobacteria infections in five states, 2008–2013*. Annals of the American Thoracic Society, 2016. **13**(12): p. 2143-2150.
74. Baldwin, S.L., et al., *The complexities and challenges of preventing and treating nontuberculous mycobacterial diseases*. PLoS neglected tropical diseases, 2019. **13**(2): p. e0007083.
75. Prevots, D.R. and T.K. Marras, *Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review*. Clinics in chest medicine, 2015. **36**(1): p. 13-34.
76. Satana, D., et al., *Prevalence and drug resistance of mycobacteria in Turkish cystic fibrosis patients*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2014. **13**(1): p. 1-6.
77. Mirsaeidi, M., et al., *Highlight on advances in nontuberculous mycobacterial disease in North America*. BioMed research international, 2014. **2014**.
78. Shah, N.M., et al., *Pulmonary Mycobacterium avium-intracellulare is the main driver of the rise in non-tuberculous mycobacteria incidence in England, Wales and Northern Ireland, 2007–2012*. BMC infectious diseases, 2016. **16**(1): p. 1-6.
79. Moore, J.E., et al., *Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006*. BMC public health, 2010. **10**(1): p. 1-6.
80. Andr ejak, C., et al., *Nontuberculous pulmonary mycobacteriosis in Denmark: incidence and prognostic factors*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2010. **181**(5): p. 514-521.
81. Diel, R., et al., *Burden of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease in Germany*. European Respiratory Journal, 2017. **49**(4).
82. Simons, S., et al., *Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia*. Emerging infectious diseases, 2011. **17**(3): p. 343.
83. Koksalan, K., et al., *The prevalence of nontuberculous mycobacterial species in cases suspected of tuberculosis in Istanbul*. Eur Respir J 2006. **28**: p. 4947.
84. Wu, U.-I. and S.M. Holland, *Host susceptibility to non-tuberculous mycobacterial infections*. The Lancet infectious diseases, 2015. **15**(8): p. 968-980.
85. Tortoli, E., *Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections*. Clinical Microbiology and Infection, 2009. **15**(10): p. 906-910.
86. Piersimoni, C. and C. Scarparo, *Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients*. The Lancet infectious diseases, 2008. **8**(5): p. 323-334.
87. Inderlied, C., C. Kemper, and L. Bermudez, *The Mycobacterium avium complex*. Clinical microbiology reviews, 1993. **6**(3): p. 266-310.
88. Grange, J., M. Yates, and E. Boughton, *A review: the avian tubercle bacillus and its relatives*. Journal of Applied Bacteriology, 1990. **68**(5): p. 411-431.

89. Dhillon, S.S. and C. Watanakunakorn, *Lady Windermere syndrome: middle lobe bronchiectasis and Mycobacterium avium complex infection due to voluntary cough suppression*. *Clinical infectious diseases*, 2000. **30**(3): p. 572-575.
90. Griffith, D.E., *Emergence of nontuberculous mycobacteria as pathogens in cystic fibrosis*. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2003. **167**(6): p. 810-812.
91. Cox, E.G., S.A. Heil, and M.B. Kleiman, *Lipoid pneumonia and Mycobacterium smegmatis*. *The Pediatric infectious disease journal*, 1994. **13**(5): p. 414-415.
92. Beckett, W., et al., *Hypersensitivity pneumonitis associated with environmental mycobacteria*. *Environmental Health Perspectives*, 2005. **113**(6): p. 767-770.
93. Field, S.K. and R.L. Cowie, *Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria*. *Chest*, 2006. **129**(6): p. 1653-1672.
94. Hermansen, T.S., et al., *Nontuberculous mycobacteria in Denmark, incidence and clinical importance during the last quarter-century*. *Scientific reports*, 2017. **7**(1): p. 6696.
95. Hazra, R., et al., *Lymphadenitis due to nontuberculous mycobacteria in children: presentation and response to therapy*. *Clinical Infectious Diseases*, 1999. **28**(1): p. 123-129.
96. Blackwell, V., *Mycobacterium marinum infections*. *Current opinion in infectious diseases*, 1999. **12**(3): p. 181-184.
97. Walsh, D.S., F. Portaels, and W.M. Meyers, *Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans infection)*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008. **102**(10): p. 969-978.
98. Saubolle, M.A., et al., *Mycobacterium haemophilum: microbiology and expanding clinical and geographic spectra of disease in humans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1996. **9**(4): p. 435-447.
99. Nightingale, S.D., et al., *Incidence of Mycobacterium avium-intracellulare complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients*. *Journal of infectious diseases*, 1992. **165**(6): p. 1082-1085.
100. JB, G., *Mycobacterium avium-intracellulare: a cause of disseminated life-threatening infection in homosexuals and drug abusers*. *Ann Intern Med*, 1982. **98**: p. 277-284.
101. Otaki, Y., et al., *A rare combination of sites of involvement by Mycobacterium intracellulare in a hemodialysis patient: multifocal synovitis, spondylitis, and multiple skin lesions*. *Nephron*, 2002. **92**(3): p. 730-734.
102. Muhammad, M.H., et al., *Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches*. *Frontiers in microbiology*, 2020. **11**: p. 928.
103. Costerton, J.W., G.G. Geesey, and K.-J. Cheng, *How bacteria stick*. *Scientific American*, 1978. **238**(1): p. 86-95.
104. Esteban, J. and M. García-Coca, *Mycobacterium biofilms*. *Frontiers in microbiology*, 2018. **8**: p. 2651.
105. Worthington, R.J., J.J. Richards, and C. Melander, *Small molecule control of bacterial biofilms*. *Organic & biomolecular chemistry*, 2012. **10**(37): p. 7457-7474.

106. Singh, S., et al., *Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents*. The open microbiology journal, 2017. **11**: p. 53.
107. Peña, J., J.R. Bargar, and G. Sposito, *Role of bacterial biomass in the sorption of Ni by biomass-birnessite assemblages*. Environmental science & technology, 2011. **45**(17): p. 7338-7344.
108. Olson, M.E., et al., *Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics*. Canadian journal of veterinary research, 2002. **66**(2): p. 86.
109. Sousa, S., et al., *Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly*. International journal of mycobacteriology, 2015. **4**(1): p. 36-43.
110. Darouiche, R.O., *Treatment of infections associated with surgical implants*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(14): p. 1422-1429.
111. Jamal, M., et al., *Bacterial biofilm and associated infections*. Journal of the chinese medical association, 2018. **81**(1): p. 7-11.
112. Polyudova, T., D. Eroshenko, and E. Pimenova, *The biofilm formation of nontuberculous mycobacteria and its inhibition by essential oils*. International journal of mycobacteriology, 2021. **10**(1).
113. Faria, S., I. Joao, and L. Jordao, *General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection*. Journal of pathogens, 2015. **2015**.
114. Bosio, S., et al., *Mycobacterium fortuitum prosthetic valve endocarditis: a case for the pathogenetic role of biofilms*. Cardiovascular Pathology, 2012. **21**(4): p. 361-364.
115. Ortíz-Pérez, A., et al., *Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2011. **29**(2): p. 79-84.
116. Forbes, B.A., et al., *Practical guidance for clinical microbiology laboratories: mycobacteria*. Clinical microbiology reviews, 2018. **31**(2): p. 10.1128/cmr.00038-17.
117. Gutierrez, C. and A. Somoskovi, *Reference Module in Biomedical Sciences, in Human Pathogenic Mycobacteria*. 2014, Elsevier.
118. Winthrop, K.L. and E.E. Roy, *Mycobacteria and immunosuppression, in Handbook of Systemic Autoimmune Diseases*. 2020, Elsevier. p. 83-107.
119. Burns, D.N., et al., *Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with Mycobacterium fortuitum: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1991. **144**(5): p. 1153-1159.
120. Bahram, N.E., et al., *Isolation and phenotypic identification of nontuberculous mycobacteria existing in Isfahan different water samples*. Advanced biomedical research, 2012. **1**.
121. Daley, C.L., et al., *Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline*. Clinical Infectious Diseases, 2020. **71**(4): p. e1-e36.
122. van Ingen, J., *Microbiological diagnosis of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease*. Clinics in chest medicine, 2015. **36**(1): p. 43-54.

123. van Ingen, J. *Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections*. in *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2013. Thieme Medical Publishers.
124. Pennington, K.M., et al., *Approach to the diagnosis and treatment of non-tuberculous mycobacterial disease*. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 2021. **24**: p. 100244.
125. Bange, F.-C. and E. Böttger, *Improved decontamination method for recovering mycobacteria from patients with cystic fibrosis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2002. **21**: p. 546-548.
126. Bange, F.-C., P. Kirschner, and E.C. Böttger, *Recovery of mycobacteria from patients with cystic fibrosis*. *Journal of clinical microbiology*, 1999. **37**(11): p. 3761-3763.
127. Ferroni, A.s., et al., *Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis*. *Journal of clinical microbiology*, 2006. **44**(6): p. 2237-2239.
128. Deshpande, V. and A.J. Iafraite, *General principles in the diagnosis of infection*. *Diagnostic pathology of infectious disease*, 2018: p. 3.
129. Bennett, J.E., R. Dolin, and M.J. Blaser, *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 2014: Elsevier Inc.
130. Madison, B., *Application of stains in clinical microbiology*. *Biotechnic & Histochemistry*, 2001. **76**(3): p. 119-125.
131. Middlebrook, G. and M.L. Cohn, *Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods*. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 1958. **48**(7): p. 844-853.
132. Wayne, L.G., *Cultivation of Mycobacterium tuberculosis for research purposes*. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*, 1994: p. 73-83.
133. Yu, M.-C., et al., *Evaluation of the rapid MGIT TBc identification test for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex strain detection*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011. **49**(3): p. 802-807.
134. Vestal, A.L., *Procedures for the isolation and identification of mycobacteria*. 1977: Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center
135. Concepcion Mediavilla-Gradolph, M., et al., *Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens*. *BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL*, 2015. **2015**.
136. Soon, W.W., M. Hariharan, and M.P. Snyder, *High-throughput sequencing for biology and medicine*. *Molecular systems biology*, 2013. **9**(1): p. 640.
137. Maxam, A.M. and W. Gilbert, *A new method for sequencing DNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977. **74**(2): p. 560-564.
138. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
139. Dey, P., *Sanger Sequencing and Next Generation Gene Sequencing: Basic Principles and Applications in Pathology*, in *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. 2023, Springer. p. 247-261.

140. Ledergerber, C. and C. Dessimoz, *Base-calling for next-generation sequencing platforms*. Briefings in bioinformatics, 2011. **12**(5): p. 489-497.
141. Woods, G.L., et al., *Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes*. 2019.
142. Wallace Jr, R.J., J. Dalovisio, and G. Pankey, *Disk diffusion testing of susceptibility of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae to antibacterial agents*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1979. **16**(5): p. 611-614.
143. Azadi, D., et al., *Mycobacteriosis and tuberculosis: laboratory diagnosis*. The open microbiology journal, 2018. **12**: p. 41.
144. Huang, W.-C., M.-C. Yu, and Y.-W. Huang, *Identification and drug susceptibility testing for nontuberculous mycobacteria*. Journal of the Formosan Medical Association, 2020. **119**: p. S32-S41.
145. Brown-Elliott, B.A., K.A. Nash, and R.J. Wallace Jr, *Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria*. Clinical microbiology reviews, 2012. **25**(3): p. 545-582.
146. Swenson, J.M., et al., *Antimicrobial susceptibility of five subgroups of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1985. **28**(6): p. 807-811.
147. Rocchetti, T.T., et al., *Detection of Mycobacterium chelonae, Mycobacterium abscessus group, and Mycobacterium fortuitum complex by a multiplex real-time PCR directly from clinical samples using the BD MAX system*. The Journal of Molecular Diagnostics, 2017. **19**(2): p. 295-302.
148. Nash, K.A., et al., *Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of Mycobacterium fortuitum*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005. **55**(2): p. 170-177.
149. Golamari, R., et al., *Rare enough? Cardiac Device-related pocket Infection due to Mycobacterium fortuitum*. Clinical Case Reports, 2021. **9**(3): p. 1566-1570.
150. Erber, J., et al., *Successful bedaquiline-containing antimycobacterial treatment in post-traumatic skin and soft-tissue infection by Mycobacterium fortuitum complex: a case report*. BMC Infectious Diseases, 2020. **20**(1): p. 1-7.
151. Greenwood, D., *Antimicrobial drugs: chronicle of a twentieth century medical triumph*. 2008: OUP Oxford.
152. Santos, D.R.d.S., et al., *Perfil de resistência de cepas de Mycobacterium fortuitum isoladas de espécimes clínicos*. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2016. **42**: p. 299-301.
153. CLSI. *Performance standards for susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and other Aerobic Actinomycetes. 2nd edition. CLSI supplement M24S*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023.
154. Pascapurnama, D.N., et al., *Identification of significant pathogenic nontuberculous mycobacteria species from presumptive TB patients using partial hsp65 gene sequencing*. Infection and Drug Resistance, 2023: p. 6923-6930.

155. Sharma, A., J. Vashistt, and R. Shrivastava, *Response surface modeling integrated microtiter plate assay for Mycobacterium fortuitum biofilm quantification*. Biofouling, 2021. **37**(8): p. 830-843.
156. Temizkan, G. and N. Arda, *Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2004: p. 101-119.
157. FinchTV, *A Brilliant Trace Viewer*. 2006, Geospiza, Inc.
158. Corpet, F., *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*. Nucleic acids research, 1988. **16**(22): p. 10881-10890.
159. Tamura, K., G. Stecher, and S. Kumar, *MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11*. Molecular biology and evolution, 2021. **38**(7): p. 3022-3027.
160. Stepanović, S., et al., *Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci*. Apmis, 2007. **115**(8): p. 891-899.
161. Sriram, R. and P. Sarangan, *Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated from cases of surgical site infections by microbroth dilution method at a Tertiary Care Center*. Journal of Marine Medical Society, 2017. **19**(1): p. 6-10.
162. Shen, Y., et al., *In vitro susceptibility of Mycobacterium abscessus and Mycobacterium fortuitum isolates to 30 antibiotics*. BioMed research international, 2018. **2018**.
163. Brown-Elliott, B.A. and G.L. Woods, *Antimycobacterial susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria*. Journal of clinical microbiology, 2019. **57**(10): p. 10.1128/jcm. 00834-19.
164. Kim, S.-Y., et al., *Species distribution and macrolide susceptibility of Mycobacterium fortuitum complex clinical isolates*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2019. **63**(6): p. 10.1128/aac. 02331-18.
165. Hatakeyama, S., et al., *Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan*. BMC infectious diseases, 2017. **17**(1): p. 1-7.
166. Aono, A., et al., *Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacteroides (Mycobacterium) abscessus complex, Mycolicibacterium (Mycobacterium) fortuitum, and Mycobacteroides (Mycobacterium) chelonae*. Journal of Infection and Chemotherapy, 2019. **25**(2): p. 117-123.
167. Fu, L., et al., *Preliminary study on drug susceptibility profile and resistance mechanisms to macrolides of clinical isolates of non-tuberculous Mycobacteria from China*. Biomedical and environmental sciences, 2018. **31**(4): p. 290-299.
168. Zheng, H.W., et al., *Antimicrobial susceptibility testing and molecular characterization of Mycobacterium fortuitum isolates in China*. Biomedical and Environmental Sciences, 2017. **30**(5): p. 376-379.
169. Lee, S.M., et al., *Evaluation of the broth microdilution method using 2, 3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride for rapidly growing mycobacteria susceptibility testing*. Journal of Korean medical science, 2007. **22**(5): p. 784-790.

170. Hershko, Y. and A. Adler, *Antimicrobial Susceptibility Distributions of Clinical Isolates of Nontuberculous Mycobacteria in Israel*. Microbial Drug Resistance, 2023.
171. Saptawati, L., et al., *Characteristics of clinical isolates of nontuberculous mycobacteria in Java-Indonesia: A multicenter study*. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2022. **16**(12): p. e0011007.
172. Esteban, J., et al., *Prevalence of erm methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria*. Clinical microbiology and infection, 2009. **15**(10): p. 919-923.
173. Özkarataş, M.H., et al., *Evaluation of Antimicrobial Susceptibilities of Rapidly Growing Mycobacteria*. Mikrobiyoloji bulteni, 2023. **57**(2): p. 220-237.
174. Brown-Elliott, B.A. and R.J. Wallace Jr, *Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria*. Clinical microbiology reviews, 2002. **15**(4): p. 716-746.
175. Hall-Stoodley, L. and H. Lappin-Scott, *Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species Mycobacterium fortuitum*. FEMS microbiology letters, 1998. **168**(1): p. 77-84.
176. Zamora, N., et al., *In-vitro evaluation of the adhesion to polypropylene sutures of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria*. Clinical microbiology and infection, 2007. **13**(9): p. 902-907.
177. Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerging infectious diseases, 2002. **8**(9): p. 881.
178. Xiang, X., et al., *Mycobacterium biofilms: factors involved in development, dispersal, and therapeutic strategies against biofilm-relevant pathogens*. Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression, 2014. **24**(3).
179. Williams, M.M., et al., *Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria*. Applied and environmental microbiology, 2009. **75**(7): p. 2091-2098.
180. Kumar, T., et al., *Chemical and ultrastructural characteristics of mycobacterial biofilms*. Asian J. Anim. Vet. Adv, 2015. **10**(10): p. 592-562.
181. O'Toole, G.A., et al., *[6] Genetic approaches to study of biofilms*. Methods in enzymology, 1999. **310**: p. 91-109.
182. Merritt, J.H., D.E. Kadouri, and G.A. O'Toole, *Growing and analyzing static biofilms*. Current protocols in microbiology, 2011. **22**(1): p. 1B. 1.1-1B. 1.18.
183. Bardouniotis, E., H. Ceri, and M.E. Olson, *Biofilm formation and biocide susceptibility testing of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium marinum*. Current microbiology, 2003. **46**: p. 0028-0032.
184. Ho, Y.S., et al., *Complete genome sequence of Mycobacterium fortuitum subsp. fortuitum type strain DSM46621*. 2012, Am Soc Microbiol.
185. Yoshida, M., et al., *Complete Genome Sequence of Mycobacterium fortuitum subsp. fortuitum JCM 6387, a Type Strain of Human-Pathogenic Mycobacteria Showing Inducible Macrolide Resistance*. Microbiology Resource Announcements, 2022. **11**(4): p. e00060-22.
186. Brown-Elliott, B.A., et al., *Emergence of Inducible Macrolide Resistance in Mycobacterium chelonae Due to Broad-Host-Range Plasmid and*

- Chromosomal Variants of the Novel 23S rRNA Methylase Gene, erm (55).*
Journal of Clinical Microbiology, 2023: p. e00428-23.
187. Hashemzadeh, M., et al., *Frequency of mutations in erm (39) related to clarithromycin resistance and in rrl related to linezolid resistance in clinical isolates of Mycobacterium fortuitum in Iran.* Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2023. **70**(2): p. 167-176.
 188. Esteban, J., et al., *Clinical significance and epidemiology of non-pigmented rapidly growing mycobacteria in a university hospital.* Journal of Infection, 2007. **54**(2): p. 135-145.
 189. Costerton, J.W., *The biofilm primer.* 2007: Springer.
 190. Saw, S., T. Whoo, and K. Perak, *Erm Gene Prevalence Determination and Phenotypic Resistance Evaluation of Mycobacterium fortuitum in Malaysia.*