

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

***MYCOBACTERIUM ABSCESSUS* ALT TÜR *ABSCESSUS*  
İZOLATLARININ İLAÇ DUYARLILIK PATERİNİNİN  
BELİRLENMESİ**

**HAZAL GÜR**

**Mikrobiyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2020**

## TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tezin seçiminde, yürütülmesinde ve yüksek lisans eğitimim boyunca yardımını ve katkısını esirgemeyen, her zaman bilgisi, tecrübesi ve önerileriyle bana yol gösteren, arkamda duran değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Sarıbaş'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hiç esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerden hep yararlandığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı başkanımız saygıdeğer hocam Prof. Dr. Cumhuriyet Özkuyumcu'ya,

Tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, bana destek olan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Sibel Ergüven'e, Doç. Dr. Alpaslan Alp'e ve Doç. Dr. Gülşen Hazırolan'a,

Mikrobiyoloji eğitimimin her aşamasında bana katkı sağlayan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, birçok konuda desteklerini gördüğüm, tecrübeleriyle bana yön veren Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalındaki tüm saygıdeğer hocalarıma,

Birlikte pek çok şey paylaştığım, yanımda olup bana destek olan, motive eden, başta İlke Toker Önder ve Selay Demirci Dos Santos Duarte olmak üzere bölümdeki ve hastanedeki tüm arkadaşlarıma,

Bana yardımcı olan, beni destekleyen ve motive eden başta Bakteriyoloji ekibi olmak üzere tüm Merkez Laboratuvar ekibine, Gülden Kaya, Nejla Kılıç, Ferhat Furkan Öz, Mehmet Emre Özbay ve tüm Mikrobiyoloji Anabilim dalı personeline,

Beni mikrobiyolojiye yönlendiren, bana destek olan ve motive eden, kendisinden pek çok şey öğrendiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Baki Akgül'e,

Ve beni bugünlere getiren, hayatımın her döneminde desteklerini, sevgilerini, esirgemeyen; başarımda başarısızlığımda hep yanımda olan; emeklerini asla ödeyemeyeceğim kendileriyle gurur ve onur duyduğum annem Makbule GÜR'e, babam Duran GÜR'e, kardeşim Ebru Pınar GÜR'e ve tüm aile bireylerime,

Saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Gür, H., *Mycobacterium abscessus* alt tür *abscessus* İzolatlarının İlaç Duyarlılık Paterninin Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020.** En önemli hızlı üreyen nontüberküloz mikobakterilerden biri olan *Mycobacterium abscessus* kompleks, akciğer ve akciğer dışı enfeksiyonlara yol açan, birçok antimikrobiyal ajana dirençli olduğundan tedavisi zor bir mikroorganizmadır. Özellikle kistik fibroz gibi altta yatan hastalığı olan kişilerde, immün yetmezliği olan kanser, transplanstasyon hastalarında neden oldukları enfeksiyonların tedavisi zor ve uzun sürmektedir. Son yıllarda da dünya genelinde birçok ülkede neden oldukları enfeksiyonlarda artış bildirilmiştir. *Mycobacterium abscessus* kompleks, *Mycobacterium abscessus* alt tür *abscessus*, *Mycobacterium abscessus* alt tür *massiliense* ve *Mycobacterium abscessus* alt tür *bolletii* olmak üzere üç alt türden oluşmaktadır ve bu alt türlerin ilaç duyarlılık paternleri farklılık göstermektedir. Bu çalışmanın amacı, *Mycobacterium abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık paternlerinin referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile belirlenmesi ve klaritromisin direncinin hem fenotipik olarak hem de gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile moleküler olarak gösterilmesidir. Çalışma sonucunda 55 *Mycobacterium abscessus* alt tür *abscessus* izolatının %87,3'ü klaritromisin, %81,9'u siprofloksasin, %40'ı imipenem, %30,9'u tobramisin, %29,1'i moksifloksasin, %7,2'si sefoksitin ve %5,4'ü amikasin dirençli saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi yapılan 55 izolatın 7'si klaritromisine duyarlı iken 15 ve 33 izolatta sırasıyla kazanılmış ve indüklenebilir klaritromisin direnci saptanmıştır. Moleküler olarak bu izolatların klaritromisin direncinin araştırıldığı *erm(41)* ve *rrl* gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonlarında duyarlılık profilleri ile uyumlu erime eğrileri gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium abscessus* alt tür *abscessus*, ilaç direnci, duyarlılık, klaritromisin, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

## ABSTRACT

**Gür, H., Detection of Drug Susceptibility Patterns of *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus*, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Microbiology Department of Microbiology Master Thesis, Ankara, 2020.**

*Mycobacterium abscessus* complex that is one of the most important rapid growing nontuberculous mycobacteria can lead to pulmonary and extrapulmonary infections and treatment of these infections is difficult due to antimicrobial resistance of this mycobacteria to most of antimicrobials. Especially treatment of *Mycobacterium abscessus* complex infection in patients with underlying disease such as cystic fibrosis and immunocompromised cancer and transplant patients is very difficult and long. In recent years, an increase in the number of infections caused by *Mycobacterium abscessus* complex has been reported in many countries around the world. *Mycobacterium abscessus* complex has three subspecies that are *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subspecies *massiliense* and *Mycobacterium abscessus* subspecies *bolletii* and their drug susceptibility patterns differ from each other. The aim of this study is to determine antibiotic susceptibility patterns of *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus* isolates with broth microdilution reference method and to demonstrate clarithromycin resistance both phenotypically with susceptibility test and genotypically with real time polymerase chain reaction. As a result of this study, of the 55 *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus* isolates, 87.3% clarithromycin, 81.9% ciprofloxacin, 40% imipenem, 30.9% tobramycin, 29.1% moxifloxacin, 7.2% ceftazidime and 5.4% amikacin resistance were detected. Of the 55 *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus* isolates tested with antibiotic susceptibility test, 7 were detected as susceptible to clarithromycin. Acquired and inducible clarithromycin resistance was detected in 15 and 33 isolates respectively. In the *erm(41)* and *rrl* real time polymerase chain reaction experiments to investigate molecular clarithromycin resistance of these isolates, melting curves consistent with their drug susceptibility profile have been shown.

**Key words:** *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus*, drug resistance, susceptibility, clarithromycin, real time polymerase chain reaction.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	3
2.2. Taksonomi	5
2.2.1. Taksonomide Yenilikler	8
2.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks	10
2.4. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM)	11
2.5. <i>Mycobacterium abscessus</i> kompleks	15
2.5.1. Tanımlama	16
2.5.2 <i>M. abscessus</i> Kompleks Patogenezi	17
2.5.3 <i>M. abscessus</i> Kompleks Hastalıkları	19
2.5.4. <i>M. abscessus</i> Kompleksin Antimikobakteriyel Duyarlılığı	23
2.5.5. <i>M. abscessus</i> Kompleksin Antimikrobiyal Direnç	25
Mekanizmaları	
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	27
3.1. <i>Mycobacterium abscessus</i> ( <i>Mycobacteriodes abscessus</i> ) alt tür <i>abscessus</i>	27
Suşları	
3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	27
3.3. <i>M. abscessus</i> alt tür <i>abscessus</i> ( <i>Mycobacteriodes abscessus</i> ) Suşlarının	28
Besiyerine Ekimi	

3.4. <i>M. abscessus</i> alt tür <i>abscessus</i> Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	28
3.5. <i>M. abscessus</i> alt tür <i>abscessus</i> Suşlarının DNA İzolasyonu	30
3.6. <i>M. abscessus</i> alt tür <i>abscessus</i> Suşlarında Klaritromisin Direncinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması	31
<b>4. BULGULAR</b>	33
4.1. <i>M. abscessus</i> alt tür <i>abscessus</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları	33
4.2. İzolatların Klaritromisin Direncinin Araştırıldığı Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları	43
<b>5. TARTIŞMA</b>	45
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	54
<b>7. KAYNAKLAR</b>	55
<b>8. EKLER</b>	66
<b>EK-1:</b> Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
<b>EK-2:</b> Tez Çalışması Dijital Makbuzu ve Orijinallik Raporu	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	70

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>A</b>	Adenin
<b>AFLP</b>	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>
<b>ARB</b>	Aside dirençli ( <i>resistant</i> ) basil
<b>ATS/IDSA</b>	<i>American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America</i>
<b>ATTC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>°C</b>	Santigrad derece
<b>CFU</b>	<i>Colony forming unit</i>
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standart Institute</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	Deoksinükleotid trifosfat
<b>DSÖ</b>	Dünya sağlık örgütü
<b>erm</b>	Eritromisin ribozom metilaz
<b>EZN</b>	Ehrlich-Ziehl-Neelsen
<b>FEV</b>	Zorlu ekspiratuar volüm
<b>G</b>	Guanin
<b>HPLC</b>	Yüksek performanslı likit kromatografi
<b>HIV</b>	İnsan immün yetmezlik virüsü
<b>KOAH</b>	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
<b>MALDI-TOF MS</b>	Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
<b>M</b>	<i>Mycobacterium</i>
<b>mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>MmpL</b>	<i>Mycobacterial membrane protein Large</i>
<b>MİK</b>	Minimum inhibitör konsantrasyon
<b>NTM</b>	Nontüberküloz mikobakteri
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>R</b>	<i>Rough</i>
<b>RFLP</b>	Restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>rRNA</b>	Ribozomal ribonükleik asit
<b>RpsL</b>	Ribozomal protein S12
<b>S</b>	<i>Smooth</i>
<b>SNP</b>	Tek nükleotit polimorfizmi
<b>T</b>	Timin
<b>TDM</b>	Tüberküloz dışı mikobakteri
<b>TLR</b>	Toll benzeri reseptör
<b>tRNA</b>	Transfer ribonükleik asit
<b>VP</b>	Ventriküloperitoneal
<b>QRDR</b>	Kinolon direncini tanımlayan bölge

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Mikobakteriyel hücre duvarının şematik gösterimi.	4
2.2. EZN tekniği ile boyanan mikobakterilerin mikroskopik görüntüsü (10x100 büyütme).	5
2.3. Mikobakterilerin sınıflandırılması.	8
2.4. <i>Mycobacterium</i> cinsinin beş ana kladı ve önerilen yeni sınıflandırma.	9
4.1. Yabanıl tip <i>rrl</i> ve mutasyona uğramış <i>rrl</i> genine ait erime eğrileri: A) Yabanıl tip <i>rrl</i> ait erime eğrileri (85°C) B) Mutasyona uğramış <i>rrl</i> genine ait erime eğrileri (85,5°C) C) Yabanıl tip <i>rrl</i> ile mutasyona uğramış <i>rrl</i> geninin birlikte (mavi tepe noktalı olan yabanıl tip <i>rrl</i> ; kırmızı tepe noktalı olan mutasyona uğramış <i>rrl</i> ) erime eğrileri.	43
4.2. <i>erm(41)-C28</i> ve <i>erm(41)-T28</i> 'e ait erime eğrileri: A) <i>erm(41)-C28</i> genine ait erime eğrileri (92°C) (tepesinde yeşil kare olan 92°C'deki erime eğrisi negatif kontrol) B) <i>erm(41)-T28</i> genine ait erime eğrileri (91,5°C) (tepesinde yeşil kare olan 89°C'deki erime eğrisi negatif kontrol) C) <i>erm(41)-C28</i> (92°C) ile <i>erm(41)-T28</i> (91,5°C) geninin birlikte (mavi tepe noktalı olan <i>erm(41)-C28</i> ; kırmızı tepe noktalı olan <i>erm(41)-T28</i> ) erime eğrileri.	44



**TABLULAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b>	<i>M. abscessus</i> kompleks için CLSI M62 rehberindeki MİK sınır değerleri.	30
<b>3.2.</b>	Gerçek zamanlı PZR deneylerinde kullanılan primerler.	31
<b>4.1.</b>	Amikasin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.	34
<b>4.2.</b>	Sefoksitin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.	35
<b>4.3.</b>	Siprofloksasin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.	36
<b>4.4.</b>	Klaritromisin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.	37
<b>4.5.</b>	İmipenem için izolatların tespit edilen MİK değerleri.	38
<b>4.6.</b>	Moksifloksasin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.	39
<b>4.7.</b>	Tobramisin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.	40
<b>4.8.</b>	<i>M. abscessus</i> alt tür <i>abscessus</i> izolatlarının antimikrobiyal direnç ve duyarlılık oranları.	41
<b>4.9.</b>	<i>M. abscessus</i> alt tür <i>abscessus</i> izolatlarının 3. ve 14. günde saptanan klaritromisin direnç ve duyarlılık oranları.	41
<b>4.10.</b>	Klaritromisin için izolatların tespit edilen MİK değerleri (14. gün).	42

## 1. GİRİŞ

*Mycobacterium* cinsi içinde yer alan tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM), nontüberküloz mikobakteriler (NTM) veya atipik mikobakteriler olarak bilinen mikobakteriler tüberküloz etkeni *Mycobacterium tuberculosis* ve lepra etkeni *Mycobacterium leprae*'dan farklı, yaygın olarak çevrede, toprakta, suda bulunan bir kısmı nonpatojen bir kısmı fırsatçı patojen olarak gruplandırılan mikobakteri türleridir (1). TDM'ler insanları ve hayvanları enfekte edebilir ve primer bir kronik hastalık veya immünsupresyon gibi çeşitli predispozan koşullar varlığında pulmoner ve ekstrapulmoner hastalıklara neden olabilirler (2).

Günümüzde 190'a yakın farklı TDM türü tanımlanmıştır ve bunlardan bazılarının hem immün sistemi sağlam hem de immün sistemi baskılanmış kişilerde ciddi enfeksiyonlara neden olduğu rapor edilmiştir (3). TDM enfeksiyonlarının bildirim zorunlu olmadığı için epidemiyolojisi tam olarak bilinmemektedir ancak son yıllarda yayınlanan TDM enfeksiyonları ile ilgili raporlara göre TDM enfeksiyonlarında ciddi bir artış bildirilmiştir (4).

*Mycobacterium abscessus* kompleks insanlarda hastalıklara neden olan, en sık izole edilen ve tedavisi zor olan hızlı üreyen TDM türlerinden biridir (5). Çevrede yaygın bulunan bu mikobakteriler hem immün sistemi sağlam hem de immün sistemi baskılanmış kişilerde akciğer ve akciğer dışı enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (5). *M. abscessus* kompleksin neden olduğu bu enfeksiyonların tedavisi klasik antitüberküloz ajanlara ve çoğu antimikrobiyale dirençli oldukları için zordur (6).

*M. abscessus* kompleksin neden olduğu enfeksiyonlarda dikkat edilmesi gereken en önemli nokta direnç oranlarının yüksek olması ve dolayısıyla tedavilerinin zor olmasıdır. Geçirgen olmayan bir hücre duvarına sahip olması, antibiyotiği modifiye veya inaktive eden enzimlere sahip olması, efluks pompaları ve hedef genlerdeki polimorfizmler birçok antibiyotik sınıfına doğal dirençli olmasına neden olmaktadır (6). Ek olarak *M. abscessus* kompleks rifampisin ve etambutol gibi klasik antitüberküloz ilaçlara da dirençlidir (6).

*M. abscessus* kompleks, *M. abscessus* alt tür *abscessus*, *M. abscessus* alt tür *massiliense* ve *M. abscessus* alt tür *bollettii* olmak üzere 3 alt türden oluşmaktadır ve

bu alt türler farklı izole edilme sıklığına ve farklı direnç profiline sahiptir (5, 7). Alt türler arasında özellikle 23S ribozomal RNA'nın metilasyonu ile makrolid direncine yol açan *erm(41)* geninin ifade düzeyindeki farklılıklar bu alt türlerin antibiyotik yanıtlarında farklılıklara neden olmaktadır (8). Özellikle tedavide en yaygın kullanılan ilaçlardan biri olan klaritromisine yanıt bu nedenle alt türler arasında değişmektedir. *M. abscessus* alt tür *massiliense* fonksiyonel olmayan *erm(41)* genine sahiptir ve bu alt türün klaritromisine duyarlılığı *M. abscessus* alt tür *abscessus* alt türünden daha yüksektir (9). *M. abscessus* kompleksin bu direnç sorunu nedeniyle tedavide kullanılacak uygun antimikrobiyal rejimin seçilmesinde, bu patojenin alt tür düzeyinde tanımlanması ve antimikrobiyal duyarlılık profilinin araştırılması büyük önem taşımaktadır (6, 10).

Çalışmamızda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tüberküloz Epidemiyolojisi Laboratuvarı'nda üretilen ve moleküler yöntemlerle tanımlanan *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık profilleri *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) rehberi (11) önerileri doğrultusunda araştırılmıştır. Ek olarak *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarında indüklenebilir klaritromisin direnci klasik yöntemlerle 14 günde tespit edilmektedir, bu direnci hızlı ve doğru bir şekilde tespit etmek amacıyla Luo ve ark. (12) önerdiği primerler ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak izolatların klaritromisin direnci moleküler olarak araştırılmıştır. Klaritromisin direncinin gerçek zamanlı PZR sonuçları, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilen klaritromisin duyarlılık sonuçları karşılaştırılmıştır. *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarında klaritromisin direnci fenotipik ve genotipik olarak gösterilmiştir.

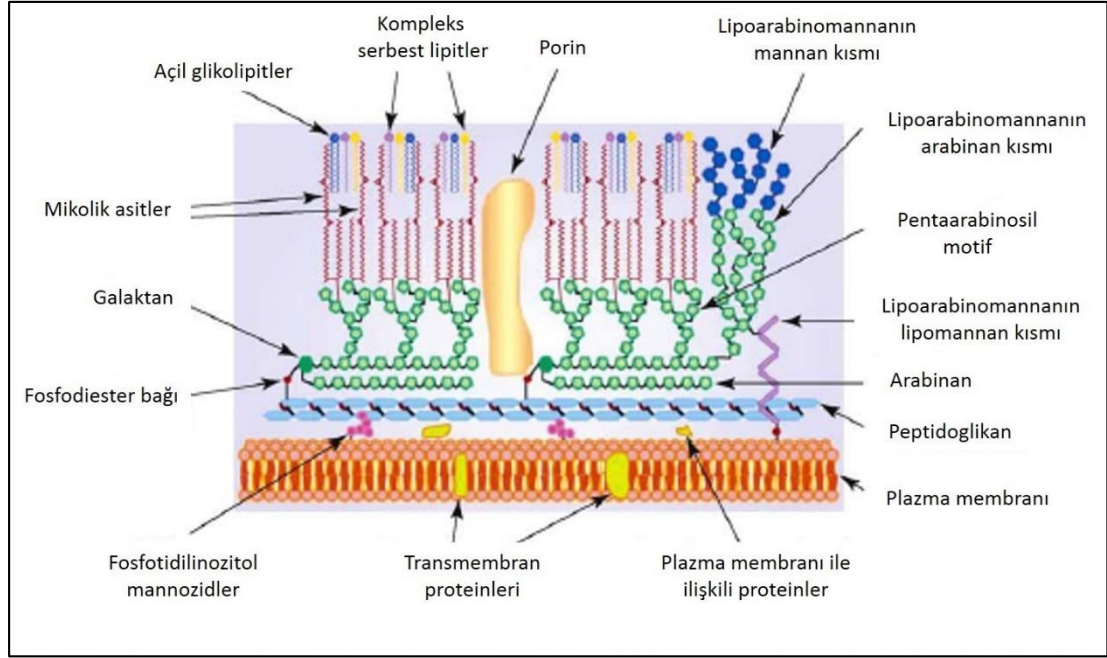
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Mikobakteriler ilk olarak 1874 yılında Armauer Hansen'in lepralı bir hastada aside dirençli basil bulmasıyla keşfedilmiştir (13). 1882 yılında ise Robert Koch ilk kez tüberküloz basilini izole etmiş ve *Mycobacterium tuberculosis* olarak isimlendirmiştir (14). On dokuzuncu yüzyılın sonlarında tavuklarda tüberküloza neden olan *M. tuberculosis*'ten farklı bir mikroorganizma tanımlanmış ve daha sonra bu mikroorganizmanın *M. avium* olduğu gösterilmiştir (15). Bu mikobakterinin ilk olarak 1950'lerde insanlarda hastalığa neden olmayacağı düşünülmüş ancak *M. avium*'un bir insan patojeni olabileceği gösterilmiştir. 1950'lerden beri yeni mikobakteriler artan bir hızla tanımlanmaktadır.

Mikobakteriler Gram pozitif, katalaz pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyan 0.2-0.6 µm x 1.0-10 µm boyutlarında çubuk şeklinde bakterilerdir (16). Koloni morfolojileri türe göre değişkendir, türe göre S tipi veya R tipi pigmentli veya pigmentless kolonileri vardır (17). Mikobakteriler zorunlu aerob mikroorganizmalardır ancak bazı türlerin mikroaerofilik koşullara da adapte olabildikleri gösterilmiştir (16).

Mikobakterilerin hücre yapısı sitoplazma, plazma membranı ve hücre duvarından oluşur. Mikobakterilerin plazma membranlarının yapısı bazı lipopolisakkaritlerin bulunması dışında tipik bakteriyel plazma membranına benzer, protein ve fosfolipitlerden oluşan çift katmanlı bir yapısı vardır (18, 19). Plazma membranının dışında peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asit esterlerinden oluşan bir hücre duvarı yapısı bulunur (Şekil 2.1.). Hücre duvarında hücre duvarı yapımından sorumlu proteinler, transport proteinleri ve sulu çözeltilerin mikolik asit katmanından pasif geçişine izin veren hidrofilik kanallar oluşturan porinler yer alır. Hücre duvar yapısının dışında ise serbest lipitlerden oluşan bir dış katman bulunur. Mikobakterilerin hücre zarfında plazma membranına tutunup hücre duvarının dışına uzanan, konak ile patojen arasındaki etkileşimde ve mikobakterilerin sinyal iletiminde önemli rol oynayan fosfatidilinositol mannozid, lipomannan ve türe özgü lipoarabinomannan gibi bazı glikolipitler bulunur (20).



**Şekil 2.1.** Mikobakteriyel hücre duvarının şematik gösterimi (21).

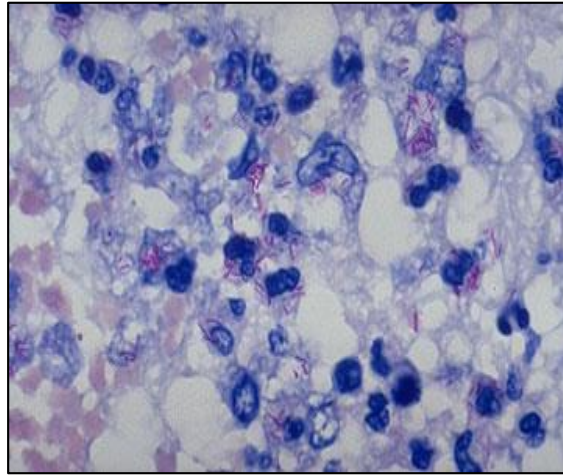
Mikobakteriler dört katmandan oluşan kalın bir hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarı bir mikolik asit içeren katman, arabinogalaktan içeren bir polisakarit katmanı ve hücre zarı ile bağlantılı bir iç peptidoglikan katmanı olmak üzere üç makromolekül katmanı ile bir arada tutulur. Peptidoglikan tabakası kendisine kovalent olarak bağlı bir heteropolisakarit olan arabinogalaktan için çatı işlevi yapar (18). Arabinogalaktan hücre geçirgenliğinin engellenmesinde ve bakterinin konakta canlılığını sürdürmesinde rol oynayan önemli bir heteropolisakarittir (22). Arabinogalaktan D-arabinoz ve D-galaktoz içerir, uçta yer alan D-arabinoz kalıntıları mikolik asitlerle esterleşir (18). Bu yüksek moleküler ağırlıklı hidrofobik mikolik asitler de glikolipit yüzey moleküllerine bağlıdır. Mikolik asitlerin hücre duvarının geçirgenliğinde, biyofilm oluşturma yeteneğinde, enfeksiyonun persistan ve aktif olarak replikasyon olan aşamalarında bakterinin patojenitesinde kilit rolü vardır (18). Mikobakterilerin hücre duvarında mikolik asit haricinde de lipid ve glikolipitler bulunur. Hücre duvarında bulunan mikolik asitler ve lipidler mikobakteri hücre duvarına hidrofobik özellik kazandırır.

Mikobakteri hücre duvarı, ağırlığının %60-70'ini oluşturan yüksek lipid içeriğine sahiptir. Yüksek lipid içeriği hücre duvarını hidrofobik hale getirir ve mikobakteriyi fagositozdan, asit, alkol, ağır metaller ve antimikrobiyal ilaç gibi

fiziksel stres faktörlerinden korur (23). Hücre duvarlarının geçirimsiz olması mikobakterilere aside dirençli olma ve hücre içi yaşama yeteneği sağlayan en temel özelliklerinden biridir.

Ayrıca mikobakterilerin asit ve alkali ortama dirençli olmasını sağlayan yüksek lipit içeriği hücre duvarının bazik boyalara geçirimsiz olmasına ve asit ve alkol solüsyonları ile dekolorize olmamalarına neden olur. Bu nedenle gram boyası ile boyanmazlar, aside dirençli bir boyama yöntemi olan Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) tekniği ile boyanırlar (24, 25).

EZN tekniğinde birincil boya olarak fenolik bir bileşik olan karbol fuksin kullanılır. Karbol fuksin yağda çözünür ve hücre duvarına nüfuz eder. Preparat buharla ısıtılarak, mumsu tabakanın erimesi ve karbol fuksin boyasının hücreye girmesi sağlanır. Asit alkolle dekolorize edilirler ve ardından zıt boya olarak metilen mavisi kullanılarak zemin boyanır. Boyama sonunda mikroskopik incelemede mikobakteriler mavi zeminde kırmızı basiller olarak görülürler (Şekil 2.2.). Mikobakteriler asit alkolle dekolorize edilemeyen aside dirençlilik özelliklerinden dolayı aside dirençli bakteri (ARB) olarak da isimlendirilir ve bu özelliği mikobakterilerin laboratuvar tanısında önemli bir ölçüttür.



**Şekil 2.2.** EZN tekniği ile boyanan mikobakterilerin mikroskopik görüntüsü (10x100 büyütme).

## 2.2. Taksonomi

Mikobakteriler Actinobacteria şubesinin Actinomycetales takımındaki *Mycobacteriaceae* ailesinde yer alırlar (Şekil 2.3.) (26). Mikobakteriler aynı takımda

yer aldığı *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Tsukamurella* gibi bakteriler ile ortak olarak hücre duvarlarında mikolik asit içerirler (27).

*Mycobacteriaceae* ailesi 1896 yılında Lehman ve Neuman tarafından *Mycobacterium* olarak isimlendirilen yalnızca bir cins içerir (28). *Mycobacterium* cinsi içindeki ilişkiler öncelikle 16S rRNA gen dizilerinin analizine ve türlerin diğer fiziksel ve kemotaksonomik özelliklerine dayanır (3). 16S rRNA'nın yanı sıra, mikobakteriyel türler arasındaki ilişkiler, 16S-23S ara dizileri ve çeşitli referans genler kullanılarak araştırılmış ve mikobakteriyel türler arasında gözlenen en önemli farklardan birinin üreme hızlarındaki farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (3, 29). Mikobakteriler temel olarak üreme hızlarına göre yavaş üreyen ve hızlı üreyen olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Hızlı üreyen mikobakteriler, katı besiyerinde genellikle 7 gün içinde görünür koloniler oluştururlar, yavaş üreyen mikobakterilerin ise katı besiyerinde görünür koloniler oluşturması daha uzun zaman alır (16).

*Mycobacterium* cinsi, patojen, potansiyel veya fırsatçı patojen ve patojenik olmayan, saprofitik türler içerir (27). Patojenik türler konaklarında çeşitli enfeksiyon hastalıklarına neden olurlar. Tüberküloz etkeni *M. tuberculosis* kompleks ve lepra etkeni *M. leprae* en önemli patojenik mikobakteri türleridir (30). Fırsatçı patojen türler ise immün sistemi baskılanmış hastalar arasında daha yaygın olan ve çeşitli enfeksiyonlara neden olan mikobakterilerdir. *M. avium*, *M. simiae*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* ve *M. haemophilum* fırsatçı patojen olan mikobakterilerdir (31). *Mycobacterium* cinsinin bir de patojenik olmayan, saprofitik türleri vardır. Bu patojenik olmayan türlere *M. smegmatis*, *M. gordonae*, *M. gilvum*, *M. vanbaalenii* örnek olarak verilebilir (32).

Mikobakteriler, *Mycobacteriaceae* familyasındaki tek cinse ait olmak, insan ve hayvanlarda patojenik potansiyelleri, rezervuarları ve kültürdeki üreme dinamikleri gibi çeşitli özelliklerde geniş ölçüde farklılık gösteren farklı bir bakteri grubudur (27). Mikobakteriler epidemiyoloji, hastalıklarla ilişkileri ve in vitro üreme kabiliyetindeki temel farklılıklara dayanarak dört gruba ayrılır, bunlar *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium ulcerans* ve nontüberküloz mikobakterilerdir (27). *Mycobacterium tuberculosis* kompleks klinik olarak en önemli patojen mikobakterilerdir. Tüberküloz etkeni olan bu mikobakteriler genetik olarak

benzer olup bazı fenotipik farklılıklar göstermelerinden dolayı *Mycobacterium tuberculosis* kompleks olarak sınıflandırılırlar ve *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caneettii*, *M. orygis*, *M. mungi* bu komplekste yer alan türlerdir (16). *M. leprae* deriyi, periferik sinir sistemini ve mukoza zarını etkileyen kronik granülomatoz bir hastalık olan lepranın etkeni olan diğer bir patojen mikobakteridir (33). Çok yavaş üreyen bir mikobakteri türü olan *M. leprae*, rutin bakteriyolojik besiyerlerinde, ticari otomatize tespit sistemlerinde veya hücre kültüründe üretilemez. *M. ulcerans* insanlarda patojendir ve dünyadaki üçüncü en yaygın mikobakteriyel hastalık olan Buruli ülserine neden olur (34).

Nontüberküloz mikobakteriler (NTM), tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) veya atipik mikobakteriler olarak da adlandırılan, insanlarda lepra ve tüberküloza neden olmayan çoğunlukla doğada, toprakta ve sularda bulunan çevresel mikobakterilerdir (1). Bu mikobakteriler sıklıkla fırsatçı patojendirler ve insanlarda pulmoner enfeksiyonlar, disemine enfeksiyonlar, lokalize deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, lenfadenitler, tendon kılıfı, kemik, eklem enfeksiyonları ve katater ilişkili enfeksiyonlara neden olurlar (35).

Günümüzde yeni tanısal testlerin gelişimiyle doğada bulunan 190'a yakın farklı tür TDM tanımlanmıştır ve dünya genelinde bildirilen neden oldukları enfeksiyonlardaki artış önem kazanmalarına neden olmuştur (3). TDM'ler Runyon sınıflandırması ile pigment özellikleri ve üreme karakteristiklerine göre sınıflandırılırlar (36). Bu sınıflandırma klinik ve taksonomik çalışmaları kolaylaştırmak için 1959'da Ernest Runyon tarafından önerilmiştir (37). Runyon sınıflandırmasına göre TDM'ler Runyon I, Runyon II, Runyon III ve Runyon IV olmak üzere dört gruba ayrılır.

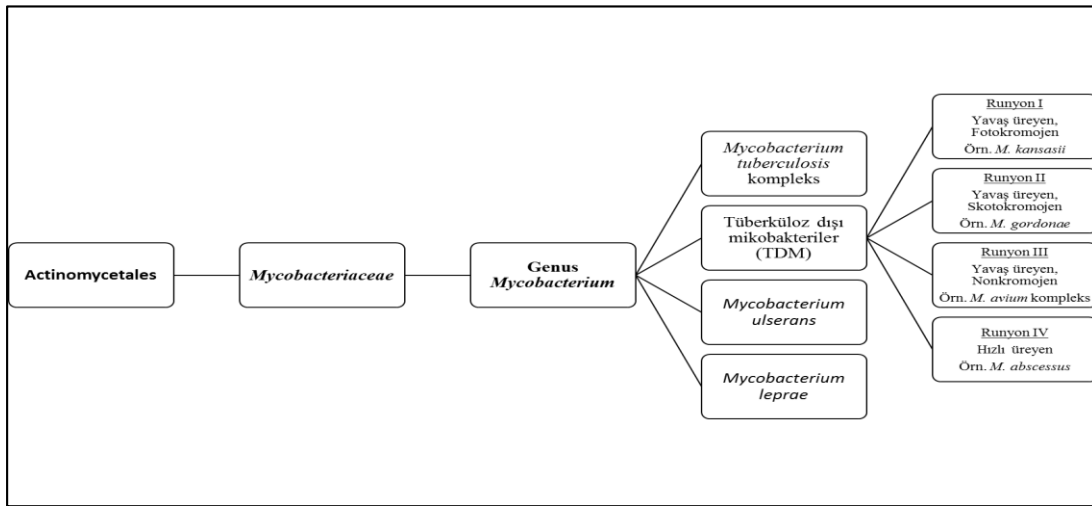
Runyon I grubunda yavaş üreyen, karanlıkta renksiz ışığa maruz kaldığında parlak sarı/turuncu pigment üreten fotokromojen atipik mikobakteriler yer alır. *M. kansasii*, *M. simiae* ve *M. marinium* bu grupta yer alan üç önemli mikobakteridir (16).

Runyon II grubunda yavaş üreyen, karanlıkta koyu sarı/turuncu pigment üreten skotokromojen atipik mikobakteriler yer alır. *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* ve *M. gordonae* bu gruptaki önemli mikobakterilerdir (16).



Runyon III grubunda yavaş üreyen pigment üretmeyen nonkromojenik atipik mikobakteriler yer alır. *M. avium* kompleks, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. terrae* bu grupta yer alan türlerdir (16).

Runyon IV grubunda ise 7 günden az sürede hızlı üreyen atipik mikobakteriler yer alır. *M. fortuitum*, *M. chelonae* ve *M. abscessus* bu grupta yer alan önemli mikobakteri türleridir (16, 35).

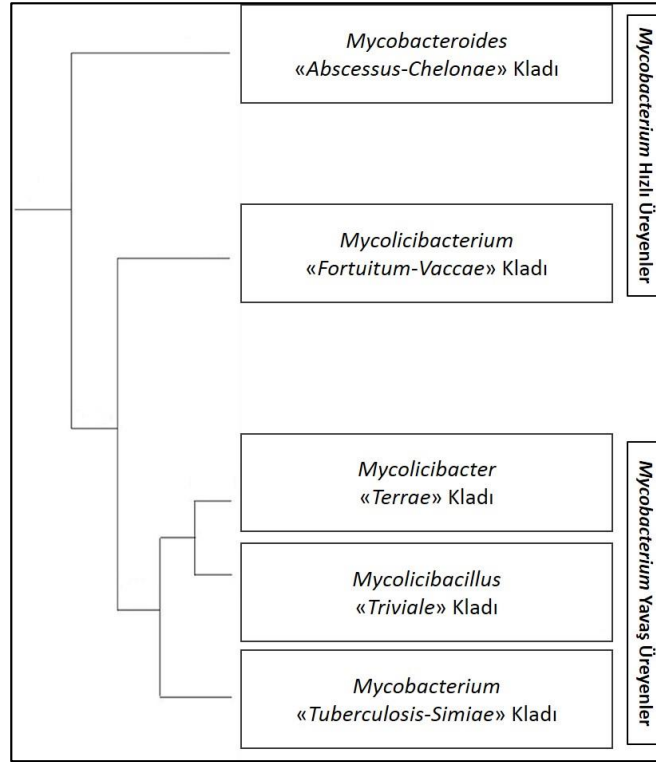


Şekil 2.3. Mikobakterilerin sınıflandırılması.

### 2.2.1. Taksonomide Yenilikler

Günümüzde genom dizileme teknolojisindeki hızlı gelişmeler ile kapsamlı filogenetik ve karşılaştırmalı genomik analizler yapılabilmesi mikobakteri türlerinin birbirleri ile ilişkileri araştırılmasına olanak sağlamıştır. Gelişen teknolojiler ve yeniliklerle birlikte yapılan kapsamlı analizler sonucunda mikobakteri türleri *Mycobacterium* cinsinden “*Tuberculosis-Simiae*” “*Terrae*”, “*Triviale*”, “*Fortuitum-Vaccae*” ve “*Abscessus-Chelonae*” klad olmak üzere beş ana monofiletik klada ayrılmıştır (Şekil 2.4.) (3). Gupta ve ark. çalışmalarında yaptıkları filogenetik ve genomik analizler sonucunda *Mycobacterium* cinsinin ayırt edilen beş klada karşılık gelen beş ayrı cinse bölünmesini önermişlerdir (3). “*Tuberculosis-Simiae*” kladının üyelerini içeren cinsin *Mycobacterium* , “*Terrae*” kladının üyelerini içeren cinsin *Mycolicibacterium* gen. nov., “*Triviale*” kladının üyelerini içeren cinsin *Mycolicibacter* gen. nov., “*Fortuitum-Vaccae*” kladının üyelerini içeren cinsin

*Mycolicibacillus* gen. nov. ve “*Abscessus-Cheloniae*” kladının üyelerini içeren cinsin ise *Mycobacteroides* gen. nov. olarak isimlendirilmesi önerilmiştir (3).



**Şekil 2.4.** *Mycobacterium* cinsinin beş ana kladı ve önerilen yeni sınıflandırma (3).

Önerilen sınıflandırmada, *Mycobacterium* cinsi içinde majör insan patojenlerinin tümü yer alırken *Mycolicibacterium* cinsi içinde esas olarak çevresel mikobakteri türleri yer alır. *Mycolicibacter* ve *Mycolicibacillus* cinsi çoğunluğu nadir durumlar dışında patojenik olmayan türleri içerir (38, 39). Önerilen *Mycobacteroides* cinsinin ise bazı üyelerinin akciğer, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile ilişkili olduğu bilinmektedir, ancak bu mikobakterilerin hiçbiri yaşamı tehdit eden patojenler olarak kabul edilmezler (38, 40). Mevcut *Mycobacterium* cinsinin önerilen beş cins bölünmesi, bilinen mikobakteriyel türler arasındaki ilişkileri anlama ve netleştirme açısından önemlidir. Ayrıca önerilen yeni sınıflandırma, önerilen yeni *Mycobacterium* cinsinin üyesi olan ana insan ve hayvan patojenik türlerini, patojenik olmayan veya daha az klinik öneme sahip olan tüm diğer mikobakteriyel türlerden ayırt etmektedir.

*Mycobacterium* cinsi koloniler oluşturmak için uygun sıcaklıklarda en az 7 gün inkübasyona ihtiyaç duyan yavaş üreyen, insan ve hayvanlar için kesin patojen mikobakteri türlerini içerir. *M. tuberculosis*, *M. leprae* ve *M. ulcerans* gibi insan için

önemli patojenler bu cins içinde yer alır (3). *Mycolicibacter* cinsinin üyeleri genel olarak *M. terrae* kompleksi olarak adlandırılır. Bu cins yavaş üreyen ve nonkromojenik türleri içerir (38, 41). Çoğu üyesi patojenik değildir, ancak insanlardan izole edilmiş bazı türleri de vardır (39). *Mycolicibacillus* cinsi, koloniler oluşturmak için uygun sıcaklıklarda 7 günden fazla inkübasyon gerektiren yavaş üreyen nonkromojenik mikobakteri türlerini içerir (3). *Mycobacteriodes* cinsi, yaygın olarak “*Abscessus-Chelonae*” kladının üyeleri hızlı üreyen mikobakteri türlerini içerir. Bu cinsin bazı üyeleri akciğer, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olur ve çoklu antimikrobiyal dirence sahiptir (6, 38). *Mycolicibacterium* cinsi ise hızlı üreyen, çoğunluğu saprofitik olup insanlar için patojen olmadığı düşünülen mikobakteri türlerini içerir (42). Ancak bu cinsin bazı üyelerinin neden olduğu bazı enfeksiyon ve hastalık vakaları da bildirilmiştir (43, 44).

### **2.3. *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks**

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks insanlarda da dahil olmak üzere geniş bir memeli yelpazesini enfekte ederek tüberküloza neden olan, yavaş üreyen mikobakterilerin oluşturduğu komplekstir. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* ve *M. pinnipedii* bu komplekste yer alan mikobakteri türleridir (45). *M. canettii*, *M. orygis*, *M. mungi* ve *M. suricattae* de bu kompleksin üyesi olarak önerilen ancak henüz onaylanmamış mikobakteri türleridir (11).

Tüberküloz, primer olarak akciğerler olmak üzere birçok organı enfekte eden *Mycobacterium tuberculosis* kompleks içinde yer alan mikobakterilerin neden olduğu sistemik hastalıktır. Enfeksiyon, bir insan veya hayvanın, akciğerlerinin alveollerine ulaşan tüberküloz basili içeren 1-5 µm büyüklüğündeki damlacık çekirdekleri bulunduğu meydana gelir (27). Maruz kalmanın ardından, *M. tuberculosis* kompleksi, konağın bağışıklık sistemi tarafından öldürülebilir, bölgesel lenf düğümleri, akciğer, böbrekler, beyin, gırtlak ve kemik gibi vücudun farklı alanlarında aktif tüberküloz hastalığına ya da latent tüberküloz enfeksiyonuna yol açabilir. Tüberküloz, aktif tüberküloz hastalığı ve latent tüberküloz enfeksiyonu olmak üzere iki farklı tabloda seyredebilir (46). Latent tüberküloz enfeksiyonu, klinik belirti veya pulmoner tüberküloz belirtileri olmayan kronik enfeksiyondur (47). Dünya nüfusunun

yaklaşık üçte birinde latent tüberküloz enfeksiyonu görülmektedir (27). Latent tüberküloz enfeksiyonları önemlidir, çünkü bu hastalar popülasyondaki *M. tuberculosis* kompleksinin majör bir rezervuarı olarak hizmet eder ve bu hastalar immün sistemi baskılanırsa aktif akciğer tüberkülozu geliştirebilirler. *M. tuberculosis* ile enfekte olmuş kişilerde yaşamları boyunca % 10 aktif tüberküloz hastalığı gelişme riski vardır (48). Aktif tüberküloz hastalığı ise primer enfeksiyonun neden olduğu veya latent tüberkülozun yeniden aktivasyonu ile oluşan çoklu organ hastalığıdır. Aktif tüberküloz hastalığı enfeksiyondan kaynaklanan klinik semptomların varlığı ile karakterizedir ve latent tüberküloz enfeksiyonuna göre tüberküloz basil yükü daha fazladır (46). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO), küresel olarak yılda yaklaşık 10 milyon insanın aktif tüberküloz hastalığı geliştirdiğini ve yaklaşık 1.5 milyon insanın hastalıktan öldüğünü tahmin etmektedir (49).

#### **2.4. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM)**

*M. tuberculosis*'in 1882'de Robert Koch tarafından keşfedilmesinden kısa bir süre sonra diğer birçok mikobakteri türü tanımlanmıştır ve bunlar atipik *M. tuberculosis* olarak kabul edilmiştir. Ancak bu atipik mikobakterilerin insanlarda hastalıklara neden olabileceği yarım yüzyıl sonra 1950'lerde kabul edilmiştir. Buhler ve Pollack 1953 yılında yayınlarında ışık altında parlak sarı pigment üreten "yellow bacillus" olarak adlandırdıkları günümüzde *M. kansasii* olarak bilinmekte olan türün neden olduğu tüberküloza benzeyen iki pulmoner hastalık vakası tanımlamışlardır (50). 1980'lerde ise bu mikobakterilerin geniş bir hastalık yelpazesine yol açtığı bilinmektedir.

Bu mikobakterilerin hastalıklara yol açığının ortaya çıkması, neden oldukları hastalıkların seyirinde ve tedavisindeki farklılıklar onların *M. tuberculosis* ve *M. leprae*'dan ayrı bir grup olarak sınıflandırılmasını gerektirmiştir. Bu mikobakteriler nontüberküloz mikobakteri (NTM), çevresel mikobakteriler, atipik mikobakteriler ve tüberküloz dışındaki mikobakteriler (TDM) olarak isimlendirilmiştir (51).

TDM'ler, tüm mikobakteriler gibi lipitten zengin kalın bir katman ile çevrili ince bir peptidoglikan tabakası olan hücre duvarına sahiptirler (52). Lipit bakımından zengin hidrofobik hücre duvarı, mikobakterilere farklı ortamlarda hayatta kalmalarını sağlayan, yüzeylere yapışma, biyofilm oluşturma, dezenfektanlara ve antibiyotiklere

direnç, yavaş üreme ve ısıya tolerans gibi bir dizi özellik sağlar. Ek olarak çevrede yaygın dağılım gösteren TDM'lerin çevrede hayatta kalmalarını sağlayan en önemli özellikleri, düşük karbon konsantrasyonlarında (oligotrof) ve oksijen konsantrasyonlarında üreme, kirleticilerde dahil olmak üzere çeşitli karmaşık hidrokarbonları parçalama ve metabolize etme yeteneğine sahip olmalarıdır (53).

TDM, çoğunlukla çevrede toprakta, yiyeceklerde, suda ve hayvanlarda yaygın olarak bulunurlar, tüberküloz ve lepraya neden olmazlar. Bu mikobakterilerin büyük çoğunluğu insanlar için patojen değildir ancak hemen hemen hepsi fırsatçı olarak davranarak predispozan koşulların varlığında hastalıklara neden olabilir (54). Bu fırsatçı patojenler özellikle kronik hastalık ve immüsupresyon gibi predispozan koşulların varlığında insanlarda pulmoner ve cilt, kemik, eklem ve dissemine enfeksiyon gibi ekstrapulmoner enfeksiyonlara neden olurlar (55). Günümüzde 190'a yakın mikobakteri türü tanımlanmıştır ve bunların yaklaşık olarak 40 tanesinin insanlarda görülen hastalıklarla ilişkili patojenik türler olduğu düşünülmektedir (56).

TDM'ler immün sistemi baskılanmış konaklar, yaşlılar, kistik fibrozlu hastalar gibi risk grubu popülasyonlarda akciğer ve akciğer dışı hastalıklara neden olurlar (57). Her ne kadar immün sistemi baskılanmış bireyler en fazla risk altındaki grup olsalar da, TDM'ler immün sistemi sağlam olan bireylerde de hastalığa neden olabilirler (58).

TDM'lerin neden olduğu akciğer hastalıkları tüm vakaların %90'ını oluşturur ve akciğer hastalığı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), bronşektazi, kistik fibroz, pnömokonyoz, önceden geçirilmiş tüberküloz, akciğer alveoler proteinozu ve özofagus motilite bozuklukları gibi yapısal akciğer hastalığı olan hastalarda yaygın olarak görülür (35). Tanı hastadan alınan örneğin kültür sonuçları, hastanın kliniği ve radyolojik bulguları birlikte değerlendirilerek konulur (35). *M. avium* kompleks, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi* ve *M. abscessus* yaygın olarak pulmoner hastalığa neden olan TDM'lerdir (59). TDM'lerin neden olduğu akciğer hastalıklarının tedavisinde uygulanacak tedavi türlerinin antibiyotik duyarlılık profilleri farklı olduğundan türe göre değişir. *M. avium* kompleks'in neden olduğu akciğer hastalıklarının tedavisinde makrolidler ve rifamisin türevleri, *M. abscessus*'un neden olduğu akciğer hastalıklarının tedavisinde amikasin, sefoksitin, imipenem ve

tigesiklin, *M. kansasii* akciğer hastalıklarının tedavisinde ise izoniazid, rifampisin ve etambutol kullanılır (35, 60).

TDM'ler, daha nadir olarak deriyi, kemikleri, eklemleri, lenfatik sistemi ve yumuşak dokuyu enfekte ederek akciğer dışı hastalıklara neden olurlar. TDM'ler lenfatik damarları enfekte ederek lenfadenitlere yol açarlar ve *M. avium* kompleks, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, ve *M. hemophilum* lenfadenitlere en sık neden olan mikobakteri türleridir (61). Komplike olmayan TDM lenfadenitinin tedavisi cerrahi eksizyondur, eğer gerekirse tedavide klaritromisin, rifamis, ya da rifampin, etambutol kullanılır (61). Nadiren hem hızlı hem yavaş üreyen TDM türleri tendon kılıflarını, kemikleri ve eklemleri enfekte ederek kronik granülomatöz enfeksiyonlara neden olabilirler. Bu enfeksiyonlar genellikle patojenin çevresel kaynaktan yada cerrahi prosedür sonucu yakında bulunan bir enfeksiyon odağından direkt inokülasyon ile, penetran travma, yaralanma veya enjeksiyon yoluyla oluşur ve etkilenen hasta grubunun çoğunluğu immün sistemi sağlam bireylerdir (61). TDM'lerin neden olduğu kas-iskelet sistemi hastalıklarının tedavisinde hastalığa neden olan mikobakteri türünün antimikrobiyal duyarlılık profiline uygun uzun süreli ilaç tedavisi ve gerekli ise cerrahi debridman uygulanır (62). TDM'lerin neden olduğu deri ve yumuşak doku enfeksiyonları travmatik yaralanma, ameliyat veya kozmetik prosedürler sonrasında yaranın çevresel mikobakterilerle kontamine toprağa, suya veya tıbbi cihazlara temas etmesi sonucu oluşurlar. *M. avium* kompleks, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis* deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sıklıkla neden olan türlerdir (56, 61). Tedavide hastalığın şiddetine göre 4-6 ay enfeksiyona neden olan mikobakteri türüne uygun antimikrobiyal tedavi ve hastalığın şiddeti ve lokalizasyonuna göre tamamlayıcı olarak cerrahi uygulanır (56). TDM'lerin çok nadir olarak merkezi sinir sistemi hastalığı, keratit ve otitis mediaya neden olduğu rapor edilmiştir (35, 61).

Ek olarak TDM'ler ağırlıklı olarak immün sistemi baskılanmış hastalarda ve çocuklarda dissemine enfeksiyonlara neden olabilirler ancak bu dissemine enfeksiyonlar insan immün yetmezlik virüsü (*Human immunodeficiency virus*, HIV) ile enfekte olmayan kişilerde çok nadir görülür (63). *M. abscessus*, *M. intracellulare* ve *M. avium* kompleks immün sistemi baskılanmış hastalarda dissemine enfeksiyona neden olan yaygın mikobakteri türleridir (64, 65).

Son otuz yıl içinde TDM izolasyon oranlarının ve ilişkili oldukları enfeksiyonların prevalansındaki dünya çapındaki artış dikkat çekmektedir (66). TDM'ler kontaminant olabileceği gibi enfeksiyon etkeni de olabildiklerinden kontaminasyon ve enfeksiyon arasındaki ayrımın yapılması önemlidir ve bu ayrımın yapılması hala bir sorun olmaya devam etmektedir (67). Ayrıca hızlı ve doğru teşhis, tür ve alt tür düzeyinde ayrımın yapılması antibiyotik duyarlılık profillerindeki farklılıklar nedeniyle önem taşımaktadır. Çünkü TDM enfeksiyonları için tedavi rejimleri, türlere bağlı olarak değişebilir ve uygun olmayan tedavi, antibiyotik direncine veya ilaç toksisitetlerine gereksiz yere maruz kalmaya neden olabilir (66). Amerikan Toraks Derneği ve Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America, ATS/IDSA) de rehberlerinde klinik olarak önemli TDM izolatlarının tür düzeyinde tanımlanmasını önermektedir (35).

TDM'lerin tür düzeyinde fenotipik olarak tanımlanmasında biyokimyasal testler ve genotipik olarak tanımlanmasında moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Biyokimyasal testler, mikobakterilerin sahip olduğu farklı biyokimyasal özelliklerinin tespitine dayanarak fenotipik tanımlama yapmayı sağlar. Nitrat indirgenmesi, niasin sekresyonu, Tween80 hidrolizi, MacConkey agarda üreme, tellürit indirgenmesi, üreaz aktivitesi, katalaz aktivitesi, arilsülfataz, pirazinamidaz ve  $\beta$ -glukosidaz ile üreme aktivitesi gibi biyokimyasal özellikleri test eden biyokimyasal testler bu mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılır (68). Ancak TDM'lerin tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan bu biyokimyasal testlerin yavaş ve daha az yaygın türleri tanımlamada başarısız olduğu düşünülmektedir (69). Hızlı ve hatasız olduğu kabul edilen tekrarlanan palindromlara dayalı PZR, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA PZR, büyük kesim parçalarının değişken alanlı jel elektroforezi (*pulsed-field gel electrophoresis*), kesim parça uzunluğu polimorfizmi (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), çoğaltılmış fragment uzunluğu polimorfizmi (*amplified fragment length polymorphism*, AFLP), gen dizileme ve çoklu (multiplex) PZR gibi moleküler yöntemler, mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında biyokimyasal testleri geride bırakmaktadır (35, 66). Ayrıca tanımlamada kullanılacak ticari PZR yöntemine dayalı hibridizasyon kitleri de mevcuttur (67). Tüm bu yöntemlere ek olarak ayrıca son zamanlarda mikobakterinin ekstrakte edilen proteinlerinin ürettiği

spektral profilin tespit edilip referans veritabanındaki proteomik verilerle karşılaştırılmasına dayanan matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) yöntemi de mikobakterilerin tür düzeyinde hızlı ve doğru tanımlanmasında etkin bir şekilde kullanılmaktadır (70, 71).

Son on yılda, dünya çapındaki TDM hastalığı vakalarının sayısı belirgin şekilde artmıştır. Günümüzde artan sayıda TDM suşunun, hem immün sistemi baskılanmış hem de immün sistemi sağlam olan hastaları etkilediğinin, şiddetli ve tedaviye dirençli enfeksiyonlardan sorumlu olduğunun tespit edilmesiyle bu mikobakteriler ciddi bir enfektif tehdit haline gelmiştir. TDM'lerin neden oldukları hastalıkların insidansı ve prevalansı tüm dünyada artmaktadır ve bu mikobakteriler hızla bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir (60).

### **2.5. *Mycobacterium abscessus* Kompleks**

*M. abscessus* kompleks, yaygın olarak toprakta ve suda bulunan, hızlı üreyen, çok ilaca dirençli TDM türlerinden oluşan bir gruptur (43). *M. avium* kompleksi içinde yer alan türler hastalıklardan sorumlu en yaygın TDM türleri olmasına rağmen *M. abscessus* kompleksi içinde yer alan türler antimikrobiyal ilaç direnci nedeniyle tedavisi daha zor enfeksiyonlara neden olan TDM türleridir (6).

*M. abscessus*, ilk kez 1952'de Moore ve Frerichs tarafından 63 yaşında bir kadının diz absesinden izole edilmiştir (72). İlk izole edildiğinde subkütanoz abse oluşturma yeteneği olan bu yeni TDM türüne *M. abscessus* adı verilmiştir. *M. abscessus* ve *M. chelonae* ilk başta benzer biyokimyasal özelliklere sahip olduklarından aynı türe ("*M. chelonei*" veya "*M. chelonae*") ait olarak kabul edilmiş, ancak 1992'de *M. abscessus* ayrı bir tür olarak yeniden sınıflandırılmıştır (43). *M. abscessus* bağımsız bir tür olarak kabul edildikten sonra, *M. massiliense* ve *M. bolletii* gibi yeni alt türleri keşfedilmiş ve genom karşılaştırmaları sonunda da *M. abscessus* kompleksin, *M. abscessus* alt tür *abscessus*, *M. abscessus* alt tür *massiliense*, ve *M. abscessus* alt tür *bolletii* olmak üzere üç alt türe sahip olduğu ortaya konmuştur (7, 73).



### 2.5.1. Tanımlama

*M. abscessus* kompleksi mikobakterilerin tanımlamasında birçok farklı biyokimyasal ve moleküler teknik kullanılmaktadır. *M. abscessus* kompleksinin tanımlanması, geleneksel olarak bunları *M. chelonae* gibi yakından ilişkili türlerden ayırmak için kullanılan fenotipik yöntemlere dayanır (43). Sodyum klorür tolerans testi, sitrat kullanım testi gibi biyokimyasal testler *M. abscessus* kompleksin tanımlanmasında kullanılan bu fenotipik yöntemlere örnek olarak verilebilir. Sodyum klorür tolerans testi, özellikle *M. abscessus* kompleksi ile *M. chelonae* arasındaki ayrımın yapılmasında kullanılan, mikobakterinin % 5 sodyum klorür içeren Löwenstein-Jensen besiyerinde üreme kabiliyetine dayanan bir testtir (74, 75). Sitrat kullanım testi ise *M. abscessus* kompleks mikobakterilerin sitratı karbon kaynağı olarak kullanmayıp, *M. chelonae* gibi hızlı üreyen diğer TDM'lerin sitratı kullanma yeteneğine dayanarak tanımlama yapmayı sağlayan bir testtir (76). Ancak, bu fenotipik yöntemler tanımlamada yeterince güvenilir ve *M. abscessus* kompleksin alt türleri arasında ayrım yapacak kadar hassas değildir (5, 75).

Mikobakterilerin mikolik asit paternlerini tespit etmeyi sağlayan yüksek performanslı sıvı kromatografi (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) yöntemi de hızlı üreyen TDM türlerini ayırt etmek için kullanılmıştır; ancak, bu yöntem ile yapılan analizlerde bazı hızlı üreyen TDM'ler benzer mikolik asit profillerine sahip olduğu için tanımlamada kullanımını sınırlıdır (77).

*M. abscessus* kompleks alt türlerinin tanımlanmasında esas olarak çeşitli referans genlerin dizilenmesine dayanan multilokus gen dizilimi ile tiplendirme (*Multilocus sequence typing*, MLST) ve *rpoB* genine dayalı tek gen dizileme yöntemi gibi moleküler yöntemler kullanılır (5, 7, 78). Tüm mikobakterilerde bulunan bakteriyel RNA polimeraz geninin b-alt birimini kodlayan tek kopya bir gen olan *rpoB* genindeki türler ve alt türler arasındaki farklılıkları tespit etmeye yönelik *rpoB* geni dizilemesi *M. abscessus* kompleks alt türlerinin ayırt edilmesinde yaygın kullanılan moleküler yöntemlerden biridir (73, 78-81). Ancak tek gen dizileme yönteminin, *M. abscessus* kompleks alt türleri arasındaki horizontal gen transferleri nedeniyle yeterince ayırt edici olmadığı rapor edilmiştir (7).

Ek olarak, MALDI-TOF MS de *M. abscessus* kompleksi tanımlama ve alt tür ayrımı yapmak için kullanılmaktadır (7, 82). Bu yöntem mikobakterilerin proteinlerinin spektral analizine dayanarak tanımlama yapar, *M. abscessus* kompleks mikobakterilerin spektral analizindeki karakteristik pikler sayesinde de alt türlerinin ayrımını yapmayı sağlar (83). MALDI-TOF MS yönteminin *M. abscessus* kompleksindeki *M. abscessus* alt tür *bolletii* ve *M. abscessus* alt tür *abscessus* alt türlerini yüksek bir doğruluk oranı ile, *M. abscessus* alt tür *massiliense* alt türünü ise çok düşük bir hata oranı ile ayırttığı gösterilmiştir (83).

### 2.5.2 *M. abscessus* Kompleks Patogenezi

*M. abscessus* kompleks çevrede yaygın olarak bulunan, hem immün sistemi baskılanmış hem de immün sistemi sağlam kişilerde akciğer, akciğer dışı veya dissemine enfeksiyonlara yol açan hızlı üreyen mikobakterilerdir (5). Bu mikobakterilerin bulaş yolu tam olarak anlaşılamamış olup, bulaşının inhalasyon, ağızdan alınma ve çevresel kaynak veya fomit ile direkt temas yoluyla olabileceği rapor edilmiştir (35, 84). Ek olarak son yıllarda tüm genom dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle kistik fibroz hastalarında kişiden kişiye bulaş olabileceği de gösterilmiştir (85).

*M. abscessus* kompleksin zorlu çevre koşullarında üreyebilme, dezenfektanlara dirençli olma, biyofilm oluşturma, hücre içinde sağkalım, immün sistemden kaçma ve koloni morfolojisinde değişiklik yetenekleri patogenezerinde önemli rol oynar (75, 86). *M. abscessus* kompleksinin lipitten zengin hidrofobik hücre zarfı, immün sistem hücreleri ile etkileşimlerinden ve makrofaj içinde sağkalım, dezenfektanlara direnç, zorlu çevre koşullarında üreyebilme, biyofilm oluşturma ve yüzeylere yapışma gibi patogenezerinde önemli yeteneklerinden sorumludur (6, 52, 75, 87, 88).

*M. abscessus* kompleksin patogenezinde önemli potansiyel virülans faktörlerinden biri koloni morfolojileridir (89). *M. abscessus* kompleks hücre duvarındaki glikopeptidolipit miktarlarındaki farklılıklar nedeniyle katı besiyerinde ürediklerinde S (*Smooth*) koloni ve R (*Rough*) koloni olmak üzere iki farklı morfolojiye sahiptir (89, 90). S koloni, hücre duvarında glikopeptidolipitleri olan, invaziv olmayan, biyofilm oluşturan morfolojüdür (89, 91). R koloni, hücre duvarında çok az miktarda

glikopeptidolipit bulunan, biyofilm oluşturmeyen invaziv, kord oluşturan morfotiptir (89, 91). *M. abscessus* kompleks bu iki morfotip arasında geçiş yapabilme yeteneğine sahiptir ve bu yetenekleri özellikle akciğer enfeksiyonlarında önemlidir (89, 92, 93).

S koloni morfotipindeki mikobakteriler sahip oldukları glikopeptidolipitler ile makrofaj ve epitelyal hücreler üzerinde bulunan Toll benzeri reseptör 2 (TLR2) tarafından tanınan hücre duvarlarındaki fosfatidil-myo-inositol mannozları gizleyerek immün yanıt oluşumunu engellerler (84, 94). İmmün yanıt oluşması engellemek için tanınmamalarını sağlamasına ek olarak glikopeptidolipitler kayma hareketi ve biyofilm oluşumu da sağlayarak *M. abscessus* kompleksin hava yollarında kolonize olmasını kolaylaştırırlar (84).

R koloni morfotipindeki mikobakteriler glikopeptidolipitlerini kaybettiklerinden, makrofajların ve respiratuar epitelyal hücrelerin üzerinde bulunan TLR2 tarafından tanınırlar ve immün yanıt oluşur (84, 94). Ayrıca R koloni morfotipinde trehaloz gibi hücre duvarı lipitleri sayesinde mikobakteriler birbiri ile etkileşerek büyük agregatlar oluştururlar, bunlar fagosite edildikten sonra makrofajın apoptozuna neden olur ve makrofaj tarafından ekstrasellüler boşluğa salınırlar (84, 95). Bu agregatlar ekstrasellüler boşlukta fagosite edilemeyen yapılar olan kord yapısını oluştururlar (84, 95). R koloni morfotipinin tanınarak inflamasyonu tetiklemesi ve kord oluşturma gibi yetenekleri enfeksiyonun yayılmasına neden olur (84, 96).

İlk olarak *M. abscessus* kompleksin S koloni morfotipi hava yollarında kolonize olur ve daha sonra kendiliğinden hücre duvarındaki glikopeptidolipitlerin kaybı ile inflamasyon ve invaziv akciğer hastalığına neden olan virülan R koloni morfotipine dönüşür (90, 94). Bu S koloni-R koloni dönüşümünden mikobakteriyel hücre zarfının biyosentezinde yer alan *Mycobacterial membrane protein Large* (MmpL) proteinlerinden birini kodlayan gendeki mutasyonun sorumlu olduğu rapor edilmiştir (92, 97, 98). Buna ek olarak sıcaklığın bu dönüşümde etkili olabileceği, yüksek sıcaklıklarda glikopeptidolipitlerin kaybedilerek S koloni morfotipinin R koloni morfotipine geçişi rapor edilmiştir (84, 94). Sıcaklığa bağlı dönüşüm ile de çevrede düşük sıcaklıkta bulunan glikopeptidolipitleri olan S koloni morfotipinin hava

yollarına girdiğinde akciğerlerin yüksek iç sıcaklığında glikopeptidolipitlerini kaybederek virülan R koloni morfotipine geçişi açıklanabilir (84).

Çevrede yaygın bulunan baskın S koloni morfotipi tipik olarak enfeksiyonların erken evrelerinde bulunurken R koloni morfotipi enfeksiyonun daha geç evrelerinde ortaya çıkmaktadır (96). Ek olarak R koloni morfotipinin S koloni morfotipinden daha patojenik olduğu çeşitli çalışmalarla in vivo gösterilmiştir ve literatürde yer alan olgu sunumları da bunu doğrular niteliktedir (95, 96). Literatürde *M. abscessus* kompleksin S koloni morfotipi ile kolonize kistik fibroz hastasında ilerleyen dönemde R koloni morfotipinin ortaya çıkmasıyla akut solunum yetmezliği geliştiği ve *M. abscessus* kompleks ile enfekte kistik fibroz hastasında akciğer fonksiyonlarının kötüleşmesi ile balgam izolatının S koloni morfotipinden R koloni morfotipine dönüşmesinin ilişkili olduğu bildirilmiştir (99). Ek olarak, kronik akciğer hastalığı olan hastaların çoğunluğundan R koloni morfotipi izole edilirken, çevresel kontaminantlardan ve yaralardan S koloni morfotipinin izole edildiği rapor edilmiştir (100).

### **2.5.3 *M. abscessus* Kompleks Hastalıkları**

*M. abscessus* kompleks içinde yer alan mikobakteriler, akciğer enfeksiyonlarına, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına, merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarına, oküler enfeksiyonlara ve bakteriyemilere neden olurlar (5).

#### **Akciğer Enfeksiyonları**

*M. abscessus* kompleksi, özellikle kistik fibroz, bronşektazi ve önceden geçirilmiş tüberküloz gibi altta yatan yapısal akciğer hastalığına sahip gruplarda akciğer enfeksiyonlarına neden olabilir (5). Bu akciğer enfeksiyonları genellikle persistan semptomlara, solunum fonksiyonunun azalmasına ve yaşam kalitesinin bozulmasına neden olan indolent fakat ilerleyici bir seyir izler ancak hastalık akut solunum yetmezliği ile fulminan bir seyir de izleyebilir (35, 101).

*M. abscessus* kompleksine bağlı akciğer enfeksiyonu tanısı koymak kolay değildir çünkü tanı konulmasında *M. abscessus* kompleks mikobakterilerinin solunum yolu örneklerinden izole edilmesi tek başına yeterli değildir. ATS/IDSA'nın 2007'de yayınladığı kılavuzlara göre, *M. abscessus* kompleksin neden olduğu akciğer

enfeksiyonların tanısı, klinik semptomların varlığı, *M. abscessus* kompleks akciğer enfeksiyonu ile uyumlu lezyonların radyografik bulguları, diğer hastalıkların uygun şekilde dışlanması ve en az ayrı alınmış 2 balgam örneğinden pozitif kültür sonucu elde edilmesi gibi klinik ve mikrobiyolojik kriterlerin yerine getirilmesini gerektirmektedir (35).

Son yıllarda, *M. abscessus* kompleksin neden olduğu akciğer enfeksiyonları kistik fibroz hastalarında yaygın olarak görülmeye başlanmıştır. Yaş, düşük vücut kitle indeksi, kötü zorlu ekspiratuar volüm (FEV1), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonunun varlığı, inhale antibiyotik kullanımı, pnömotoraks ve diğer geçirilen tıbbi müdahaleler kistik fibroz hastalarında görülen *M. abscessus* kompleksine bağlı akciğer enfeksiyonuna neden olan risk faktörleridir (102). Ek olarak Bryant ve ark. çalışmalarında kistik fibroz hastalarında *M. abscessus* alt tür *massiliense* mikobakterisinin insandan insana bulaşabileceğine dair güçlü kanıtlar elde etmişlerdir (85). Bu nedenlerle, kistik fibroz hastaları *M. abscessus* kompleksi akciğer enfeksiyonları için risk grubu önemli hasta popülasyonudur.

*M. abscessus* kompleksin neden olduğu akciğer enfeksiyonlarının tedavisi oldukça zordur ve standart bir tedavisi yoktur (5). Mevcut kılavuzlar intravenöz olarak uygulanan antimikrobiyal ajanlarla kombinasyon halinde makrolid bazlı tedavinin uygulanmasını önermektedir (35).

### **Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları**

*M. abscessus* kompleks, travmatik yaralanma, cerrahi yara veya çevresel maruz kalma sonucu kontamine malzeme veya su ile doğrudan temas ederek ve dissemine enfeksiyonlarda deri veya yumuşak dokunun sekonder tutulumu yoluyla deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olabilir (103). Bu enfeksiyonlar immün sistemi baskılanmış hastalarda görülebileceği gibi immün sistemi sağlam kişilerde de görülebilir (104). İmmün sistemi baskılayan ilaç kullanan, malign neoplazmı, diabetes mellitusu veya bağ dokusu hastalığı olan hastalar *M. abscessus* kompleksin neden olduğu deri ve yumuşak doku enfeksiyonları için risk grubunda yer alırlar (105). *M. abscessus* kompleks, estetik prosedürler, dövme yapılması, akapunktur, vücut piercingi takılması, protez malzemeye maruz kalma, kalp pili yerleştirme, intravenöz kateter

kullanımı ve deri altı enjeksiyonlar gibi işlemler sonrası deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olabilir (103-105). Ek olarak *M. abscessus* kompleks kaplıcalarda kontamine suya maruz kalma yoluyla da deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına yol açabilir.

*M. abscessus* kompleksin neden olduğu deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisi hastalığın şiddetine göre toplam 4-6 haftalık bir antibiyotik tedavisi planlanır (106). Enfeksiyonun şiddeti hafif olan hastalara tedavide makrolid ve florokinolon grubu oral veya topikal antibiyotikler kullanılır (106). Mevcut rehberlere göre ciddi enfeksiyonu olan hastalarda tedavide klaritromisin, azitromisin gibi makrolid grubu oral antibiyotiklerle birlikte birkaç hafta parenteral olarak amikasin ile kombine sefoksitin veya imipenem kullanılır ve bu tedavi rejiminde en az 2 hafta parenteral antibiyotiklerle başlangıç tedavisi önerilir (35). Ek olarak hastalığın durumuna ve tedavi yanıtına göre cerrahi tedavi de yapılabilir (106).

### **Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonları**

*M. abscessus* kompleks nadir olarak serebral apseler, menenjit gibi merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarına neden olabilir (5). *M. abscessus* kompleks, beyin cerrahi operasyonları, travma, intrakraniyal implantlar, otomastoidit ve dissemine enfeksiyonlar yoluyla merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarına yol açar (107). Özellikle ventriküloperitoneal (VP) şant *M. abscessus* bağlı enfeksiyonlar için önemli bir risk faktörüdür ve literatürde de VP şant ile ilişkili 3 enfeksiyon vakası bildirilmiştir (108-110).

Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalar *M. abscessus* kompleksin neden olduğu merkezi sinir sistemi enfeksiyonları için risk grubu hastalardır ve bu hastalarda yüksek mortaliteye sahiptir (111). Ancak immün sistemi baskılanmış önemli bir hasta grubu olan HIV ile enfekte hastalarda TDM'lerin neden olduğu merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında yaygın etkenin *M. abscessus* kompleks değil *M. avium* kompleks olduğu, *M. abscessus* kompleksin ise HIV seronegatif hastalarda merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarının yaygın etkeni olduğu literatürde rapor edilmiştir (111).

*M. abscessus* kompleksin neden olduğu merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarının tedavisi zordur çünkü tedavide serebrospinal sıvıya yeterli miktarda geçecek etkili

antibiyotiklere ihtiyaç vardır (112). Tedavide mikobakterinin ilaç duyarlılığına bağlı olarak en az biri parenteral olarak uygulanan 2 veya 3 antibiyotiğin kombinasyonu kullanılır (35). Bu tedavide en az 12 ay boyunca amikasin, sefoksitin, imipenem veya florokinolon kullanılmaktadır (111). Ancak makrolidlerin ve amikasinin serebrospinal sıvıya geçişleri iyi değildir bu nedenle tedavide serebrospinal sıvıya geçişleri iyi olan linezolid ve klofazamin tercih edilebilir (113-115). Kombine antimikobakteriyel tedaviye ek olarak, enfekte olmuş yabancı cisimler, implante edilmiş kateterler veya VP şantları gibi tıbbi ekipman çıkarılır (112).

### **Oküler Enfeksiyonlar**

*M. abscessus* kompleks keratit, kanalikülit, dakriyosistit, sklerit, endoftalmit ve implant enfeksiyonları gibi oküler enfeksiyonlara neden olabilir (116, 117). Bu enfeksiyonlara cerrahi travma, kontamine prostetik madde, korneal metalik cisimler, antiseptik çözelti veya su yoluyla yol açar (118). Göz ameliyatı geçirilmesi, kontakt lens kullanımı, kontamine suya maruz kalma, oküler travma ve immün sistemin baskılanması *M. abscessus* kompleks oküler enfeksiyonları için risk faktörleridir (119, 120). Ek olarak literatürde son yıllarda *M. abscessus* kompleksin neden olduğu oküler enfeksiyonların insidansında artış bildirilmiştir (112).

*M. abscessus* kompleksin neden olduğu oküler enfeksiyonların tedavisinde topikal bir florokinolona ile birlikte intravenöz aminoglikozit ve makrolid kullanılmaktadır (113, 120). Antimikobakteriyel tedaviye ek olarak gerekli durumlarda enfekte dokunun cerrahi debridmanı da yapılmaktadır (113). Bu oküler enfeksiyonlarda tedavi süresi ortalama 5 ay olup, hastanın klinik yanıtına göre tedavi süresi değişmektedir (5, 112).

### **Bakteriyemi**

*M. abscessus* kompleks özellikle immün sistemi baskılanmış diyabeti olan, son dönem böbrek hastalığı olan, uzun süre kortikosteroid kullanan veya kanser hastalarında bakteriyemilere neden olabilir (121). Bu bakteriyemiler genellikle venöz katater kullanımı ile ilişkilidir (122). Tedavide enfeksiyon katater ile ilişkili ise katater çıkartılmaktadır ve izolatin antibiyotik duyarlılık profiline göre intravenöz antimikrobiyal uygulanmaktadır (122). Literatürde *M. abscessus* kompleksin neden

olduğu bakteriyemilerin tedavisinde kombine olarak klaritromisin, amikasin, sefoksitin ve imipenem kullanıldığı rapor edilmiştir (123, 124).

### **Yaygın Enfeksiyonlar**

*M. abscessus* kompleks, nadir olarak yüksek mortaliteye sahip yaygın enfeksiyonlara neden olabilir (125, 126). Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda bu enfeksiyonlar daha yaygındır (5). Organ transplant alıcıları, otoimmün hastalıklar için kortikosteroid tedavisi alanlar ve HIV pozitif hastalar *M. abscessus* kompleksin neden olduğu yaygın enfeksiyonlar için risk grubudur (5, 125). Ancak bu yaygın enfeksiyonlar HIV negatif hastalarda da görülebilir (5).

*M. abscessus* kompleksin neden olduğu yaygın enfeksiyonların tedavisinde izolatın antimikrobiyal duyarlılık profili gözönüne alınarak içinde amikasinin de bulunduğu 2-3 antimikrobiyal ajanın kombinasyonu kullanılmaktadır (126). Mevcut rehberlerde tedavide klaritromisin veya azitromisin ile amikasin, sefoksitin, imipenem gibi parenteral antibiyotiklerin kombine olarak kullanılması önerilmektedir (35).

#### **2.5.4. *M. abscessus* Kompleksin Antimikobakteriyel Duyarlılığı**

*M. abscessus* kompleks standart antitüberküloz ajanlara ve antimikrobiyal ajanların çoğuna dirençlidir (6). Tedavide kullanılacak rejimin belirlenmesine, antimikrobiyal duyarlılık testleri rehberlik eder (112).

*M. abscessus* kompleksin de içinde bulunduğu hızlı üreyen TDM'ler için amikasin, tobramisin, sefoksitin, klaritromisin, azitromisin, linezolid, imipenem, siprofloksasin, moksifloksasin, doksisiklin, tigesiklin, rifabutin ve trimetoprim-sülfametaksazol antimikrobiallerinin duyarlılığının test edilmesi önerilmektedir (11). *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarında tigesiklin ve/veya klofaziminin de test edilebileceği ancak bu ilaçların sınır değerlerinin bulunmadığı belirtilmektedir (11). Önerilen antimikrobiyal duyarlılık testi katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyerinde sıvı mikrodilüsyondur (11).

CLSI önerileri doğrultusunda test edilen ilaçlar arasında *M. abscessus* kompleksin duyarlı olduğu en iyi antimikobakteriyel aktiviteye sahip ilaçların amikasin, klaritromisin ve sefoksitin olduğu rapor edilmiştir (5, 127). Ek olarak



klofazamin ve rifabutinin de *M. abscessus* komplekse karşı in vitro antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (128, 129).

*M. abscessus* kompleksinin farklı alt türleri farklı antimikrobiyal duyarlılık profillerine sahiptir. Bu nedenle etkili antimikrobiyal rejim belirlenirken bu nokta göz önünde bulundurulmalıdır. Diğer alt türlere göre daha nadir izole edilen *M. abscessus* alt tür *bolletii*, *M. abscessus* kompleks için kullanılması önerilen ilaçlara karşı dirençlidir (130). *M. abscessus* alt tür *abscessus* ve *M. abscessus* alt tür *massiliense* arasında *erm(41)* geni yüzünden makrolid özellikle klaritromisin direncinde farklılıklar bulunmaktadır (131). *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarının çoğu makrolid direncine neden olan *erm(41)* genine sahip iken *M. abscessus* alt tür *massiliense* izolatlarının çoğu fonksiyonel olmayan *erm(41)* genine sahiptir (132). Bu nedenle *M. abscessus* alt tür *massiliense* izolatlarının klaritromisin duyarlılık oranları *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarından daha yüksektir (132). Cho ve ark. da çalışmalarında *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatları için klaritromisin direnç oranını %84.1, *M. abscessus* alt tür *massiliense* izolatları için klaritromisin direnç oranını %6.3 olarak rapor etmişlerdir (133).

*M. abscessus* kompleksinin alt tür ayrımının yapılması özellikle neden oldukları akciğer enfeksiyonlarının tedavisinin daha etkili planlamasında çok önemlidir (127). Örneğin alt türlerin klaritromisin duyarlılık profilleri birbirinden farklıdır ve klaritromisin içeren tedavinin etkisi enfeksiyona neden olan alt türe göre farklılık gösterir (5). *M. abscessus* alt tür *abscessus*'un aksine, *M. abscessus* alt tür *massiliense* indüklenebilir klaritromisin direncine sahip değildir ve bu alt türün neden olduğu enfeksiyonun tedavisinde klaritromisin kullanılabilir (132).

*M. abscessus* kompleks için literatürde çoğu antimikrobiyale karşı yüksek direnç oranları rapor edilmiştir ve bu *M. abscessus* komplekse etkili yeni antimikrobiyal ajanların araştırılması gerekliliğini göstermiştir. Literatürde tigesiklin, bedaquiline, omadasiklin ve Galyum nitrat gibi yeni ajanların ve rifampin-biopenem kombinasyonu gibi yeni kombinasyonların *M. abscessus* kompleks için antimikobakteriyel aktiviteleri rapor edilmiştir (134-138).

### 2.5.5. *M. abscessus* Kompleksin Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

*M. abscessus* kompleks çoğu antimikrobiyal ajana dirençlidir veya direnç geliştirmektedir. Bu antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasında da *M. abscessus* kompleksin doğal direnç mekanizmaları ve kazanılmış direnç mekanizmaları rol oynamaktadır (6).

#### Doğal Direnç Mekanizmaları

*M. abscessus* komplekste doğal dirençten yavaş üremeleri, fiziksel ve kimyasal bir bariyer olan geçirgen olmayan hücre duvarları, ilaç dışı atım sistemleri ve hedef genlerin genetik mutasyonları sorumludur (6).

Mikobakteriyel hücre duvarı yüksek lipit içeriği ve kalınlığı ile hidrofilik ve lipofilik ajanlar için etkili bir bariyer görevi görmekte ve hücrenin toksik hücre dışı bileşiklere karşı korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (139, 140). *M. abscessus* kompleks bazı antibiyotiklere karşı geçirgen olmayan hidrofobik hücre duvarı yüzünden doğal dirençlidir (140). Bazı hidrofilik antimikrobiyaller ve bileşikler de hücre zarından porinler aracılığı ile geçmekte ancak hücre içindeki direnç mekanizmaları ile etkisiz hale getirilmektedir (6, 141).

*M. abscessus* kompleks, antibiyotikleri parçalayarak, modifiye ederek veya antibiyotiğin hedefini modifiye ederek onları etkisiz hale getirecek enzimler üretmektedir (6, 142). *M. abscessus* kompleks rifampisin direncine neden olabilecek rifampisin ADP-ribosiltransferaz ve mono-oksijenaz enzimlerine sahiptir (44). Ayrıca, aminoglikozit 2-N-asetil transferaz ve aminoglikozit fosfotransferaz gibi asetil veya fosfat kalıntılarını transfer ederek aminoglikozid ilaçları modifiye edip inaktif hale getiren enzimler içerir (143, 144). *M. abscessus* kompleks sahip olduğu flavin monooksijenaz enzimi ile tetrasiklin direncine neden olabilmektedir (142). Ek olarak, *M. abscessus* kompleksin beta laktam antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olan beta laktamları parçalayan beta laktamaz enzimlerini kodlayan genlere sahip olduğu rapor edilmiştir (6, 44). *M. abscessus* kompleks hedefi modifiye ederek makrolid direncine neden olan eritromisin ribozom metilaz (*Erm*) enzimine sahiptir (75). *M. abscessus* komplekste makrolidlere karşı doğal dirençten, makrolidler tarafından

indüklenen uyarılabilir bir gen olan *erm(41)* geninin ifadesinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (131).

*M. abscessus* komplekste dirence neden olan mekanizmalardan biri de aktif dışa atım mekanizmalarıdır. Dışa atım pompası mekanizmaları, toksik molekülleri veya metabolitleri hücre dışına atarak bu mikobakterileri toksik moleküllere karşı koruma ve hücre homeostazını ve fizyolojik dengeyi korumayı sağlamakta, bunun yanı sıra antimikrobiyalleri de dışarı atarak dirence neden olabilmektedir (145, 146). Çeşitli çalışmalarda, *M. abscessus* komplekste dışa atım mekanizmalarının makrolid, aminoglikozit, bedaquiline ve klofazamin direnci ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (147-149).

*M. abscessus* kompleks ilaç direnci oluşmasında rol oynayan bir transkripsiyonel regülatör ailesi olan *whiB* gen ailesine sahiptir (6, 142). *M. abscessus* komplekste *whiB7* transkripsiyonel regülatörü makrolid ve aminoglikozit direncine neden olan genlerin modüle ederek dirençte rol oynadığı rapor edilmiştir (142).

*M. abscessus* komplekste ilaçlar tarafından hedeflenen korunmuş genlerdeki polimorfizm direnç gelişmesine neden olabilecek bir diğer mekanizmadır (6). *M. abscessus* komplekste de etambutol ve florokinolonlara bu mekanizma ile direnç geliştiği rapor edilmiştir (150, 151).

### **Kazanılmış Direnç Mekanizmaları**

*M. abscessus* komplekste doğal direnç mekanizmaları haricinde antimikrobiyalin temel hedeflerindeki spontan mutasyonlar direnç gelişmesine neden olabilir (6).

Çeşitli çalışmalarda, *M. abscessus* komplekste aminoglikozit, makrolid ve florokinolonlara karşı kazanılmış direnç bildirilmiştir (6, 75). *M. abscessus* komplekste 16S rRNA'daki *rrs* genindeki spontan tek nokta mutasyonlarının aminoglikozit direnci ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (152, 153). *M. abscessus* komplekste 23S rRNA'daki *rpl* genindeki nokta mutasyon sonucu makrolid direnci kazanıldığı rapor edilmiştir (154, 155). Ek olarak *M. abscessus* alt tür *massiliense* izolatlarında gyrase A alt ünitesindeki *gyrA* genindeki mutasyon sonucu siprofloksasin direnci rapor edilmiştir (156).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. *Mycobacterium abscessus* (*Mycobacteriodes abscessus*) alt tür *abscessus* Suşları

Bu tez çalışmasına *Mycobacterium abscessus* (*Mycobacteriodes abscessus*) alt tür *abscessus* izolatlarının duyarlılık paternlerinin araştırılması amacıyla Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tüberküloz Epidemiyolojisi Laboratuvarı'nda tanımlanan 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatı dahil edildi.

Bu çalışmada antimikrobiyal duyarlılık testlerimizde kalite kontrol suşu olarak CLSI M62 kılavuzunda önerilen *Staphylococcus aureus* (*American Type Culture Collection*, ATCC 29213) numaralı suşu ve duyarlı olduğu bilinen *Mycobacterium peregrinum* (ATCC 14476) suşları kullanıldı.

#### 3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

##### Kullanılan malzemeler:

Löwenstein Jensen besiyeri  
Katyon ayarlı Mueller Hinton besiyeri  
Klaritromisin  
Siprofloksasin  
Moksifloksasin  
Amikasin  
İmipenem  
Sefoksitin  
Tobramisin  
ATCC suşları (ATCC 29213, ATCC 14476)  
Cam boncuklu dilüsyon tüpü  
0,5 McFarland standart  
U tabanlı 96 kuyucuklu plak  
Falkon tüp  
Enjektör filtresi  
Dimetil sülfoksit (DMSO)

Santrifüj tüpü

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kiti

Primerler

Gerçek zamanlı PZR için tüp

**Kullanılan cihazlar:**

Isı bloğu

Etüv

Hassas Terazi

Sınıf 2 biyogüvenlik kabini

Santrifüj cihazı

Gerçek zamanlı PZR cihazı

Vortex

+4°C buzdolabı

-20°C dondurucu

-80°C dondurucu

Antibiogram sonuçlarını okumak için ayna

**3.3. *M. abscessus* alt tür *abscessus* (*Mycobacteriodes abscessus*) Suşlarının Besiyerine Ekimi**

Öncelikle kullanılacak suşlar, Sınıf 2 biyogüvenlik kabini içinde, kişisel güvenlik kurallarına uyularak, steril şartlarda, stoktaki suşlardan otomatik pipet yardımıyla 100 µl alınarak hazır olarak satın alınan steril Löwestein Jensen besiyerine ekildi. Löwestein Jensen besiyerine pasajlanan suşlar hafif eğik bir şekilde, 37°C'lik etüvde 7 gün inkübe edildi. Yedi gün boyunca düzenli olarak her gün suşların üreme ve kontaminasyon kontrolleri yapıldı. Löwestein Jensen besiyerinde üretilen bu suşlar antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanıldı.

**3.4. *M. abscessus* alt tür *abscessus* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri**

*M. abscessus* alt tür *abscessus* suşları için antimikrobiyal duyarlılık testleri CLSI M24 rehberinin önerdiği yöntem olan katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyerinde sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yapıldı (11). CLSI M24 rehberi önerileri

doğrultusunda *M. abscessus* alt tür *abscessus* suşları için klaritromisin, siprofloksasin, moksifloksasin, amikasin, imipenem, sefoksitin ve tobramisin antimikrobiyallerinin duyarlılıkları test edildi.

Öncelikli olarak toz formdaki antibiyotikler uygun çözücü kullanılarak çözüldü ve antibiyotik stokları hazırlandı. Amikasin, tobramisin, moksifloksasin, siprofloksasin ve imipenem distile suda; klaritromisin ve sefoksitin DMSO'da çözülerek stok antibiyotik solüsyonları hazırlandı. Stok antibiyotik solüsyonları hazırlanırken istenen konsantrasyonda olmaları için gereken miktarlar antibiyotik üzerinde belirtilen potense göre Formül 3.1. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ağırlık(mg)} = \frac{\text{Hacim(ml)} \times \text{İstenilen konsantrasyon}(\mu\text{g/ml})}{\text{Potens}(\mu\text{g/mg})} \quad (3.1.)$$

Antimikrobiyal duyarlılık testi için test edilen antimikrobiyaller 96 kuyucuklu plaklarda amikasin için 0,5-256  $\mu\text{g/mL}$ , tobramisin için 0,125-64  $\mu\text{g/mL}$ , siprofloksasin için 0,0625-32  $\mu\text{g/mL}$ , moksifloksasin için 0,0625-32  $\mu\text{g/mL}$ , klaritromisin için 0,125-64  $\mu\text{g/mL}$ , imipenem için 0,125-64  $\mu\text{g/mL}$  ve sefoksitin için 1-512  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralıklarında hazırlandı.

Öncelikle plakların her kuyucuğuna 100  $\mu\text{l}$  besiyeri konuldu. Antibiyotik solüsyonundan ilk kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  eklendi ve 2 kat seri dilüsyon yapıldı. Son iki kuyucuğun biri üreme kontrol biri besiyeri kontrol yapıldı. Plaklar kullanılıncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$  dondurucuda saklandı.

Löwenstein Jensen besiyerinde üremiş olan mikobakteri kolonilerinden içinde cam boncuk ve steril distile su bulunan tüpler içine alındı ve inokulum konsantrasyonu 0.5 McFarland standart bulanıklığa ayarlandı. 0.5 McFarland standart bulanıklığa ayarlanan mikobakteri süspansiyonundan 50  $\mu\text{l}$  alınarak son konsantrasyon  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  olacak şekilde 10 ml katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyerine eklendi. Bu mikobakteri süspansiyonundan antimikrobiyaller eklenerek hazırlanmış plaklardaki her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  konuldu ve  $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$  inkübatörde 72 saat inkübe edildi. Üreme kontrol kuyucuğuna antimikrobiyal eklenmeyip sadece mikobakteri eklenerek üreme kontrol edildi. 72 saat sonunda plaklardaki üremeler görsel olarak ayna yardımıyla değerlendirildi ve suşların minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) saptandı. Klaritromisin için indüklenebilir direncini saptamak amacıyla inkübasyon 14 güne

uzatıldı. Klaritromisin plakları 14 gün boyunca inkübe edildi ve 14 gün sonunda tekrar değerlendirildi.

Antibiyotik duyarlılık testinin değerlendirilmesinde, öncelikle kalite kontrol suşlarının belirtilen MİK aralıklarında olmasına, üreme ve besiyeri kontrol çukurlarının doğru sonuç vermesine dikkat edildi. *S. aureus* ATCC 29213 suşu için, 37°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra; *M. peregrinum* ATCC 14476 suşu için 30±2 derecede 72 saat inkübe edildikten sonra MİK değerleri okundu ve CLSI M62 rehberindeki değerlere göre değerlendirildi (157).

*M. abscessus* suşlarının duyarlılık sonuçları ise CLSI M62 rehberindeki sınır değerlere göre değerlendirildi. Saptanan MİK değerleri Tablo 3.1. de belirtilen CLSI M62 rehberindeki sınır değerlerle karşılaştırıldı ve suşlar duyarlı, orta duyarlı (intermitant) veya dirençli olarak sınıflandırıldı (157).

**Tablo 3.1.** *M. abscessus* kompleks için CLSI M62 rehberindeki MİK sınır değerleri.

Antimikrobiyal Ajan	MİK (µg/MI)		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Amikasin	≤16	32	≥64
Sefoksitin	≤16	32-64	≥128
Siprofloksasin	≤1	2	≥4
Klaritromisin	≤2	4	≥8
İmipenem	≤4	8-16	≥32
Moksifloksasin	≤1	2	≥4
Tobramisin	≤2	4	≥8

### 3.5. *M. abscessus* alt tür *abscessus* Suşlarının DNA İzolasyonu

Antimikrobiyal duyarlılık testi yapılan 55 izolatın tümüne klaritromisin direncinin moleküler olarak araştırılması için DNA izolasyonu yapıldı.

*M. abscessus* alt tür *abscessus* suşlarının DNA izolasyonu, Luo ve ark.nın çalışmalarındaki kaynatma protokolüne göre yapıldı (12). Löwenstein Jensen besiyerinde üreyen mikobakteri kolonilerinden öze yardımıyla alınarak steril distile su içinde süspansiyon edildi. Süspansiyon 100°C’de 20 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra 16000xg’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası 100 µl süpernatant etiketlenmiş başka bir steril santrifüj tüpüne aktarıldı. PZR deneyleri yapılana kadar -20°C dondurucuda saklandı.

### 3.6. *M. abscessus* alt tür *abscessus* Suşlarında Klaritromisin Direncinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması

Bu deney ile *M. abscessus* alt tür *abscessus*'ta klaritromisin direnci gerçek zamanlı PZR yapılarak kısa sürede saptanmaya çalışıldı. Bu amaçla Luo ve ark.'nın önerdiği protokoldeki primerler kullanıldı (12). Her primer çifti için gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi.

Spontan gelişen klaritromisin direnci, 23S rRNA'da peptidiltransferaz bağlayıcı bölgedeki mutasyon ile gelişmektedir. Gerçek zamanlı PZR ile bu bölgeyi kodlayan *rrl* geni çoğaltıldı ve 2058 veya 2059 pozisyonlarındaki ilaç direncinden sorumlu mutasyonlar farklı erime eğrisi sıcaklıkları elde edilmesiyle belirlendi. Bu reaksiyon için *rrl*-FWD-1, *rrl*-2058mut-REV-3 ve *rrl*-2059mut-REV-3 primerleri kullanıldı.

İndüklenebilir klaritromisin direncini göstermek için *erm*(41) geninin 28. pozisyonundaki timin hedef alındı. Bu genin fonksiyonel olması indüklenebilir ilaç direncini göstermektedir. Bu reaksiyon için *erm*(41)-T28-FWD-2 ve *erm*(41)-REV-4 primerleri kullanıldı ve gerçek zamanlı PZR sonrası, erime eğrisi analizi ile saptandı.

Duyarlı izolatlarda fonksiyonel *erm*(41)-C28 geninin ve yabancı tip *rrl* geninin gösterilmesi için de gerçek zamanlı PZR yapıldı. Bu reaksiyonlarda *erm*(41)-C28 için *erm*(41)-C28-FWD-2 ve *erm*(41)-REV-4; yabancı tip *rrl* için *rrl* FWD-1 ve *rrl* 2058-9wt-REV-1 primerleri kullanıldı.

**Tablo 3.2.** Gerçek zamanlı PZR deneylerinde kullanılan primerler. (Primer dizileri Luo ve ark. çalışmalarından (12) alınmıştır.)

Primer	Hedef	Primer Dizisi	Ürün Büyüklüğü (bp)
<i>erm</i> (41)-C28-FWD-2 <i>erm</i> (41)-REV-4	<i>erm</i> (41)-C28	GTCGCGACGCCAGC GCCACCGGAAGGCGAG	197
<i>erm</i> (41)-T28-FWD-2 <i>erm</i> (41)-REV-4	<i>erm</i> (41)-T28	GTCGCGACGCCAGT GCCACCGGAAGGCGAG	197
<i>rrl</i> FWD-1 <i>rrl</i> 2058-9wt-REV-1	Yabancı tip <i>rrl</i> geni	CAGTAAACGGCGGTGGTAAC AGGTCCCGGGTCTTT	179
<i>rrl</i> -FWD-1 <i>rrl</i> -2058mut-REV-3 <i>rrl</i> -2059mut-REV-3	Mutasyona uğramış <i>rrl</i> geni	CAGTAAACGGCGGTGGTAAC AGGTCCCGGGTCTTV AGGTCCCGGGTCTV	179

Gerçek zamanlı PZR deneyleri için *SsoAdvanced universal SYBR Green* süpermiks kullanıldı. Kullanıma hazır *SsoAdvanced universal SYBR Green* süpermiks



antikor aracılı sıcak başlangıç Sso7d füzyon polimerazı (*antibody-mediated hot start Sso7d fusion polymerase*), deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP), MgCl<sub>2</sub>, Syber Green I boyası, artırıcılar (*enhancers*), stabilizörler, pasif referans boyaların karışımını içermektedir. Süpermiksin protokolüne göre 10 µl toplam hacimli reaksiyon için 5 µl *SsoAdvanced universal SYBR Green 2x* süpermiksten, 0.3'er µl son konsantrasyonu 300 nanomolar olacak şekilde 10 µM forward ve reverse primerlerden, 2 µl DNA ve 10 µl'ye tamamlamak için 2.4 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Süpermiks protokolünün Bio-Rad CFX96 cihazı için önerdiği termal döngü protokolü gerçek zamanlı PZR deneyimize uygun şekilde optimize edildi. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu için 95°C'de 15 dakika, 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 45 döngü ve 65-95°C'de 0.5°C artış 5 saniye/adım protokolü kullanıldı. Primerlerin erime sıcaklıklarına göre 65-95°C aralığındaki erime eğrileri değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *M. abscessus* alt tür *abscessus* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Çalışmamızda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tüberküloz Epidemiyolojisi Laboratuvarı'nda üretilen 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* suşunun klaritromisin, siprofloksasin, moksifloksasin, amikasin, imipenem, sefoksitin ve tobramisin, antimikrobiyal duyarlılık testleri CLSI M24 rehberine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı ve antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda okunan MİK değerleri CLSI M62 rehberinde belirtilen değerlere göre değerlendirildi.

*M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatların MİK değerleri amikasin için Tablo 4.1.'de, sefoksitin için Tablo 4.2.'de, siprofloksasin için Tablo 4.3.'te, klaritromisin için Tablo 4.4.'te, imipenem için Tablo 4.5.'de, moksifloksasin için Tablo 4.6.'da ve tobramisin için Tablo 4.7.'de sunulmuştur.

**Tablo 4.1.** Amikasin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.

İzolat	MİK Değerleri (µg/mL)									
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Mab1						X				
Mab2					X					
Mab3					X					
Mab4				X						
Mab5				X						
Mab6					X					
Mab7						X				
Mab8					X					
Mab9				X						
Mab10					X					
Mab11	X*									
Mab12					X					
Mab13						X				
Mab14							X			
Mab15							X			
Mab16						X				
Mab17								X		
Mab18						X				
Mab19								X		
Mab20								X		
Mab21						X				
Mab22						X				
Mab23							X			
Mab24						X				
Mab25						X				
Mab26						X				
Mab27							X			
Mab28						X				
Mab29					X					
Mab30							X			
Mab31						X				
Mab32						X				
Mab33					X					
Mab34						X				
Mab35						X				
Mab36							X			
Mab37						X				
Mab38					X					
Mab39					X					
Mab40								X		
Mab41							X			
Mab42						X				
Mab43							X			
Mab44						X				
Mab45						X				
Mab46						X				
Mab47						X				
Mab48					X					
Mab49							X			
Mab50		X								
Mab51		X								
Mab52						X				
Mab53						X				
Mab54					X					
Mab55				X						

\*: ≥başlangıç konsantrasyonundan

**Tablo 4.2.** Sefoksitin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.

İzolat	MİK Değerleri (µg/mL)									
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
Mab1					X					
Mab2						X				
Mab3						X				
Mab4							X			
Mab5						X				
Mab6		X								
Mab7	X									
Mab8					X					
Mab9					X					
Mab10						X				
Mab11					X					
Mab12						X				
Mab13					X					
Mab14	X									
Mab15						X				
Mab16					X					
Mab17						X				
Mab18	X									
Mab19								X		
Mab20						X				
Mab21						X				
Mab22						X				
Mab23							X			
Mab24						X				
Mab25					X					
Mab26					X					
Mab27								X		
Mab28				X						
Mab29					X					
Mab30							X			
Mab31						X				
Mab32					X					
Mab33						X				
Mab34					X					
Mab35						X				
Mab36					X					
Mab37						X				
Mab38						X				
Mab39					X					
Mab40							X			
Mab41					X					
Mab42				X						
Mab43						X				
Mab44					X					
Mab45						X				
Mab46					X					
Mab47						X				
Mab48						X				
Mab49						X				
Mab50							X			
Mab51						X				
Mab52						X				
Mab53					X					
Mab54				X						
Mab55					X					

**Tablo 4.3.** Siprofloksasin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.

İzolat	MİK Değerleri (µg/mL)									
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062
Mab1				X						
Mab2			X							
Mab3		X								
Mab4		X								
Mab5			X							
Mab6	X*									
Mab7			X							
Mab8				X						
Mab9		X								
Mab10	X									
Mab11			X							
Mab12			X							
Mab13		X								
Mab14		X								
Mab15		X								
Mab16		X								
Mab17		X								
Mab18	X									
Mab19									X	
Mab20				X						
Mab21			X							
Mab22			X							
Mab23					X					
Mab24					X					
Mab25			X							
Mab26					X					
Mab27				X						
Mab28		X								
Mab29		X								
Mab30				X						
Mab31					X					
Mab32		X								
Mab33					X					
Mab34						X				
Mab35					X					
Mab36		X								
Mab37				X						
Mab38	X									
Mab39	X									
Mab40					X					
Mab41				X						
Mab42				X						
Mab43		X								
Mab44	X									
Mab45		X								
Mab46	X									
Mab47		X								
Mab48	X									
Mab49					X					
Mab50				X						
Mab51	X									
Mab52		X								
Mab53			X							
Mab54				X						
Mab55				X						

\*: ≥başlangıç konsantrasyonundan



**Tablo 4.5.** İmipenem için izolatların tespit edilen MİK değerleri.

İzolat	MİK Değerleri (µg/mL)									
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Mab1		X								
Mab2			X							
Mab3		X								
Mab4		X								
Mab5			X							
Mab6			X							
Mab7		X								
Mab8		X								
Mab9		X								
Mab10			X							
Mab11		X								
Mab12			X							
Mab13		X								
Mab14		X								
Mab15		X								
Mab16			X							
Mab17			X							
Mab18		X								
Mab19			X							
Mab20		X								
Mab21			X							
Mab22	X*									
Mab23						X				
Mab24		X								
Mab25			X							
Mab26		X								
Mab27			X							
Mab28		X								
Mab29		X								
Mab30						X				
Mab31				X						
Mab32			X							
Mab33				X						
Mab34				X						
Mab35			X							
Mab36		X								
Mab37				X						
Mab38			X							
Mab39		X								
Mab40			X							
Mab41			X							
Mab42		X								
Mab43			X							
Mab44			X							
Mab45				X						
Mab46		X								
Mab47		X								
Mab48			X							
Mab49			X							
Mab50					X					
Mab51				X						
Mab52			X							
Mab53			X							
Mab54			X							
Mab55			X							

\*: ≥başlangıç konsantrasyonundan

**Tablo 4.6.** Moksifloksasin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.

İzolat	MİK Değerleri (µg/mL)									
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062
Mab1							X			
Mab2							X			
Mab3						X				
Mab4							X			
Mab5					X					
Mab6				X						
Mab7			X							
Mab8								X		
Mab9					X					
Mab10				X						
Mab11							X			
Mab12						X				
Mab13						X				
Mab14				X						
Mab15				X						
Mab16				X						
Mab17				X						
Mab18				X						
Mab19				X						
Mab20			X							
Mab21						X				
Mab22							X			
Mab23								X		
Mab24						X				
Mab25				X						
Mab26							X			
Mab27								X		
Mab28					X					
Mab29					X					
Mab30							X			
Mab31								X		
Mab32				X						
Mab33							X			
Mab34							X			
Mab35							X			
Mab36			X							
Mab37							X			
Mab38					X					
Mab39					X					
Mab40							X			
Mab41							X			
Mab42								X		
Mab43	X									
Mab44					X					
Mab45						X				
Mab46					X					
Mab47					X					
Mab48					X					
Mab49							X			
Mab50								X		
Mab51				X						
Mab52						X				
Mab53				X						
Mab54					X					
Mab55					X					



**Tablo 4.7.** Tobramisin için izolatların tespit edilen MİK değerleri.

İzolat	MİK Değerleri (µg/mL)									
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Mab1					X					
Mab2				X						
Mab3					X					
Mab4					X					
Mab5					X					
Mab6					X					
Mab7		X								
Mab8					X					
Mab9					X					
Mab10						X				
Mab11	X*									
Mab12				X						
Mab13					X					
Mab14					X					
Mab15					X					
Mab16				X						
Mab17					X					
Mab18					X					
Mab19					X					
Mab20					X					
Mab21						X				
Mab22					X					
Mab23						X				
Mab24						X				
Mab25					X					
Mab26						X				
Mab27					X					
Mab28					X					
Mab29					X					
Mab30						X				
Mab31				X						
Mab32					X					
Mab33				X						
Mab34			X							
Mab35						X				
Mab36					X					
Mab37					X					
Mab38				X						
Mab39					X					
Mab40							X			
Mab41						X				
Mab42					X					
Mab43					X					
Mab44					X					
Mab45				X						
Mab46				X						
Mab47					X					
Mab48				X						
Mab49						X				
Mab50				X						
Mab51					X					
Mab52				X						
Mab53			X							
Mab54				X						
Mab55	X									

\*: ≥başlangıç konsantrasyonundan

Antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarına göre, 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının direnç ve duyarlılık oranları Tablo 4.8.'de verilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde klaritromisin için plakların inkübasyonu 14 güne uzatılarak indüklenebilir klaritromisin direnci araştırıldı. İzolatların klaritromisin için 3 günlük inkübasyon ve 14 günlük inkübasyon sonundaki direnç oranları Tablo 4.9'da verilmiştir. Üçüncü günde duyarlı olarak saptanan 38 izolatın 31'i (%56,4) plakların inkübasyonu 14 güne uzatıldığında klaritromisine indüklenebilir dirençli saptandı. On dört günlük inkübasyon sonunda toplamda 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 33'ünde (%60) indüklenebilir direnç saptanmıştır.

**Tablo 4.8.** *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarının antimikrobiyal direnç ve duyarlılık oranları.

Antimikrobiyal Ajanlar	MİK Aralığı	İzolat sayısı n (%)		
		Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Amikasin	2 - $\geq$ 256	48/55 (%87,3)	4/55 (%7,3)	3/55 (%5,4)
Sefoksitin	4 – 512	30/55 (%54,6)	21/55 (38,2)	4/55 (%7,2)
Siprofloksasin	0.125 - $\geq$ 32	2/55 (%3,6)	8/55 (%14,5)	45/55 (%81,9)
İmipenem	2 - $\geq$ 64	3/55 (%5,4)	30/55 (%54,6)	22/55 (%40,0)
Moksifloksasin	0.25 – 32	27/55 (%49,1)	12/55 (%21,8)	16/55 (%29,1)
Tobramisin	1 - $\geq$ 64	10/55 (%18,2)	28/55 (%50,9)	17/55 (%30,9)

**Tablo 4.9.** *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarının 3. ve 14. günde saptanan klaritromisin direnç ve duyarlılık oranları.

	MİK Aralığı	İzolat sayısı n (%)		
		Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Klaritromisin (3 gün)	0.125 - 64	38/55 (%69,1)	2/55 (%3,6)	15/55 (%27,3)
Klaritromisin (14 gün)	0.125 - $\geq$ 64	7/55 (%12,7)	-	48/55 (%87,3)

Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde, *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarında 3 günlük inkübasyon sonucundaki en yüksek direnç oranı siprofloksasine saptanırken, indüklenebilir klaritromisin direnci değerlendirildiğinde, 14 günlük inkübasyon sonucunda, en yüksek direnç klaritromisine saptanmıştır. Klaritromisin 14 günlük inkübasyon sonundaki MİK değerleri de Tablo 4.10. 'da verilmiştir. Ek olarak bu izolatlarda en düşük direnç saptanan başka bir deyişle en duyarlı antimikrobiyalin amikasin olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 4.10.** Klaritromisin için izolatların tespit edilen MİK değerleri (14. gün).

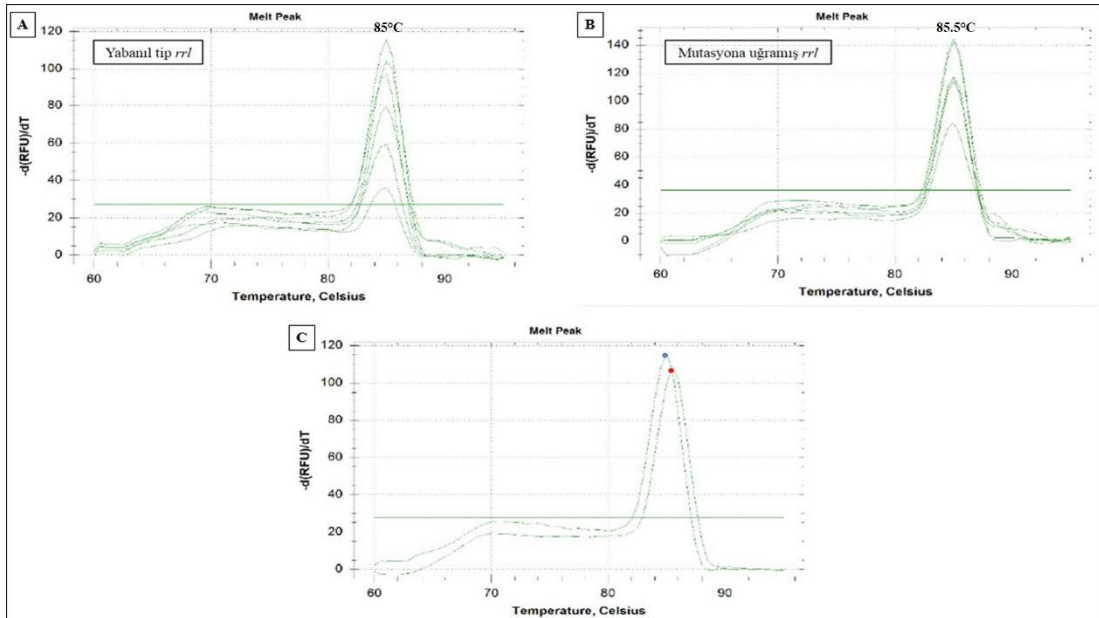
İzolat	MİK Değerleri (µg/mL)									
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Mab1	X									
Mab2	X*									
Mab3								X		
Mab4	X									
Mab5		X								
Mab6	X									
Mab7	X									
Mab8	X									
Mab9	X*									
Mab10	X*									
Mab11	X*									
Mab12	X*									
Mab13	X*									
Mab14	X*									
Mab15	X									
Mab16	X									
Mab17	X*									
Mab18	X									
Mab19	X*									
Mab20	X									
Mab21	X									
Mab22	X									
Mab23		X								
Mab24		X								
Mab25	X*									
Mab26	X*									
Mab27	X									
Mab28	X*									
Mab29	X*									
Mab30									X	
Mab31	X*									
Mab32	X*									
Mab33	X*									
Mab34	X*									
Mab35	X*									
Mab36	X*									
Mab37	X									
Mab38	X*									
Mab39	X									
Mab40	X									
Mab41	X									
Mab42	X									
Mab43	X									
Mab44	X									
Mab45	X*									
Mab46	X									
Mab47	X*									
Mab48	X*									
Mab49		X								
Mab50	X									
Mab51									X	
Mab52									X	
Mab53										X
Mab54										X
Mab55										X

\*: ≥başlangıç konsantrasyonundan

## 4.2. İzolatların Klaritromisin Direncinin Araştırıldığı Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları

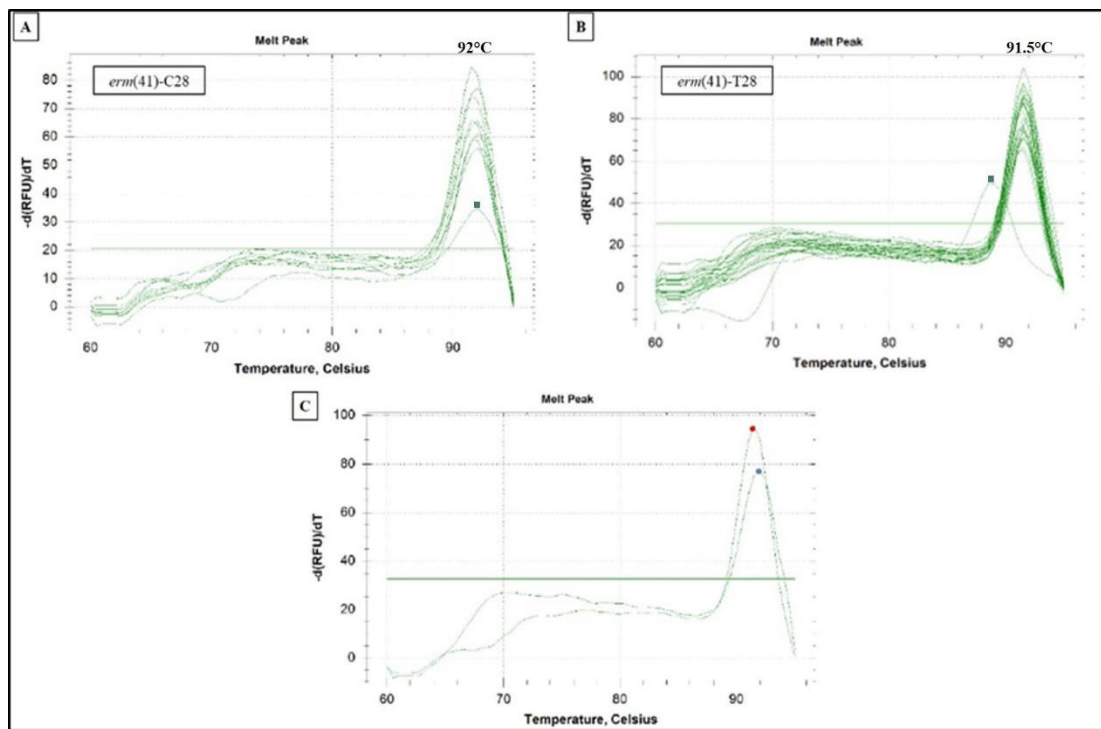
Çalışmamızda fenotipik duyarlılık testlerine ek olarak *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarının klaritromisin direnci ve indüklenebilir klaritromisin direnci gerçek zamanlı PZR yöntemi ile erime eğrisi analizi yapılarak moleküler olarak araştırılmıştır. Ek olarak, duyarlı izolatların klaritromisin duyarlılıkları, yabancı tip *rml* ve *erm(41)-C28* için iki ayrı gerçek zamanlı PZR yapılarak moleküler olarak da gösterilmiştir. Duyarlı 7 izolatın tamamında (%100) yabancı tip *rml* için 85°C’de (Şekil 4.1.(A)) ; *erm(41)-C28* için 92°C’de (Şekil 4.2. (B)) erime eğrisi saptanmıştır.

Dirençli izolatlarda kazanılmış klaritromisin direncini saptamak amacıyla *rml* 2058/2029 mutant primerleri ile gerçek zamanlı PZR yapılmıştır ve erime eğrileri analiz edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR sonucunda dirençli 15 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 13’ünde (%86,67) 85,5°C’de mutasyona uğramış *rml* genine ait erime eğrisi tespit edilmiştir (Şekil 4.1. (B)). Yabancı tip *rml* ve mutasyona uğramış *rml* genine ait erime eğrileri Şekil 4.1.(C)’de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Yabancı tip *rml* ve mutasyona uğramış *rml* genine ait erime eğrileri: A) Yabancı tip *rml* ait erime eğrileri (85°C) B) Mutasyona uğramış *rml* genine ait erime eğrileri (85,5°C) C) Yabancı tip *rml* ile mutasyona uğramış *rml* geninin birlikte (mavi tepe noktalı olan yabancı tip *rml*; kırmızı tepe noktalı olan mutasyona uğramış *rml*) erime eğrileri.

İndüklenebilir klaritromisin direncini saptamak amacıyla *erm(41)*-C28 ve *erm(41)*-T28 primerleri ile iki ayrı gerçek zamanlı PZR yapılmıştır ve erime eğrileri analiz edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR sonucunda duyarlı 7 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatında 92°C’de *erm(41)*-C28’e ait erime eğrisi; 33 indüklenebilir dirençli *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 28’inde (%84,85) ise 91,5°C’de *erm(41)*-T28’e ait erime eğrisi gösterilmiştir. Fonksiyonel olmayan *erm(41)*-C28 ve fonksiyonel *erm(41)*-T28’e ait erime eğrileri Şekil 4.2.’de sunulmuştur. İzolatların gerçek zamanlı PZR deneyleri sonucu elde edilen erime eğrileri, fenotipik duyarlılık testi sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.



**Şekil 4.2.** *erm(41)*-C28 ve *erm(41)*-T28’e ait erime eğrileri: A) *erm(41)*-C28 genine ait erime eğrileri (92°C) (tepesinde yeşil kare olan 92°C’deki erime eğrisi negatif kontrol) B) *erm(41)*-T28 genine ait erime eğrileri (91,5°C) (tepesinde yeşil kare olan 89°C’deki erime eğrisi negatif kontrol) C) *erm(41)*-C28 (92°C) ile *erm(41)*-T28 (91,5°C) geninin birlikte (mavi tepe noktalı olan *erm(41)*-C28; kırmızı tepe noktalı olan *erm(41)*-T28) erime eğrileri.

Ek olarak, gerçek zamanlı PZR deneyleri sonucunda duyarlı izolatlarda *erm(41)*-T28 ve mutant *rrl* primerleri ile yapılan reaksiyonlarda anlamlı bir erime eğrisi tespit edildi. Benzer şekilde indüklenebilir dirençli izolatlarda *erm(41)*-C28 ve kazanılmış dirençli izolatlarda yabancı tip *rrl* primerleri ile yapılan PZR deneylerinde anlamlı bir erime eğrisi saptanamadı.

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde artan vaka sayıları ve çalışmalarla önem kazanan TDM'ler çevrede yaygın olarak bulunan, insanlarda ve hayvanlarda tüberküloz ve lepra dışında çeşitli enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenlerdir. Son zamanlarda TDM hastalıklarının prevalansının artmasıyla TDM'ler önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir (158).

TDM'ler 7 gün içinde üreyen hızlı üreyen ve üremesi için daha uzun süre gereken yavaş üreyen mikobakteriler olmak üzere iki grupta sınıflandırılırlar. Özellikle hızlı üreyen TDM'ler kazanılmış immün yetmezlik sendromu olan veya immün sistemi baskılayan ilaç alan organ nakli hastaları gibi hem immün sistemi baskılanmış hastalarda hem de immün sistemi sağlam kişilerde pulmoner ve ekstrapulmoner enfeksiyonlara yol açan önemli bir klinik sorundur (159).

*M. abscessus* kompleks hızlı üreyen TDM'ler arasında prevalansı en fazla ve en virülan patojendir (35). Klinikte yaygın olarak görülen *M. abscessus* kompleks in vitro olarak birçok antibiyotiğe dirençlidir ve bu direnç neden oldukları enfeksiyonların tedavisinde zorluklara ve olumsuz tedavi sonuçlarına yol açmaktadır (6). Artan prevalans ve direnç nedeni ile *M. abscessus* kompleks önem kazanmaktadır (158).

*M. abscessus* kompleks suşlarının diğer hızlı üreyen TDM türlerine göre daha virülan olduğu bilinmektedir (160). Çeşitli mikobakteri türleri için de doğal ve indüklenebilir antibiyotik direnci, R koloni morfolojisi, biyofilm oluşumu gibi virülans faktörleri bildirilmiş olmasına rağmen *M. abscessus* kompleks suşlarının glikopeptidolipitlerine bağlı morfotip varyasyonu bu suşların virülansının diğer hızlı üreyen mikobakteri türlerinden daha yüksek olmasını açıklamaktadır (90). Hücre duvarının önemli bileşenlerinden biri olan glikopeptidolipitler S koloni morfotipini R koloni morfotipinden ayıran önemli bir bileşendir (84). S koloni morfotipi biyofilm oluşumundan sorumlu olan morfotiptir ve biyofilmler uzun süre düşük antibiyotik konsantrasyonlarına maruz kaldığında çeşitli antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olmaktadır (160).

*M. abscessus* kompleks enfeksiyonlarının tedavisi intrinsek ve indüklenebilir direnç, biyofilm oluşumu gibi faktörler nedeniyle zordur (131, 161). Bu mikobakteriler birinci basamak antitüberküloz ajanlara dirençlidir ancak birkaç antibiyotiğe duyarlıdır (43). Bu mikobakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için pulmoner enfeksiyonlar için en az 12 ay, ekstrapulmoner enfeksiyonlar için 6 ay süreli uzun süreli antibiyotik tedavi gereklidir (35). Uzun süreli antibiyotik tedavisine rağmen başarı oranı diğer enfeksiyon hastalıklarına göre düşük ve rekürens oranı yüksektir. Ek olarak yetersiz antibiyotik konsantrasyonları ile tedavi ve tedavinin kesilmesi *M. abscessus* kompleks enfeksiyonlarının tedavisini daha da zorlaştırmaktadır (160).

Çoklu ilaç direnci nedeniyle tedavisi zor olan *M. abscessus* kompleks enfeksiyonlarının tedavisinde uzun süreli intravenöz tedavi gerekmektedir ve bu tedavide çeşitli yan etkiler yaygın olarak görülmektedir (162). *M. abscessus* kompleksin neden olduğu pulmoner enfeksiyonlarının tedavisinde ATS/IDSA rehberi duyarlılık sonuçlarına göre planlanan klaritromisine ek intravenöz amikasin ve sefoksitin veya imipenemden oluşan makrolid bazlı çoklu ilaç tedavisini önermektedir (35). Neden oldukları ektrapulmoner enfeksiyonların tedavisinde ise pulmoner enfeksiyonların tedavisine benzer olarak duyarlılık sonuçları göz önünde bulundurularak planlanan makrolid bazlı çoklu ilaç tedavi rejimi önerilmektedir (5, 35).

*M. abscessus* kompleks enfeksiyonlarının tedavisinin planlanmasında antimikrobiyal duyarlılık testleri önemli rol oynamaktadır. Rehberler antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçları değerlendirilerek planlanan tedavi rejimlerini önermektedir (35). *M. abscessus* kompleks için antimikrobiyal duyarlılık testleri CLSI M24 rehberinin hızlı üreyen TDM'ler için olan önerileri doğrultusunda amikasin, sefoksitin, siprofloksasin, klaritromisin, doksisiklin, imipenem, linezolid, moksifloksasin, trimetoprim-sülfametaksazol ve tobramisin için sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yapılmaktadır (35). Bu çalışmada da *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarının amikasin, sefoksitin, siprofloksasin, klaritromisin, imipenem, moksifloksasin ve tobramisin için duyarlılıkları rehber önerileri doğrultusunda referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile araştırılması amaçlanmıştır.

Aminoglikozit bir antibiyotik olan amikasin, *M. abscessus* kompleks enfeksiyonlarının antimikrobiyal kemoterapisindeki önemli ilaçlardan biridir (163). Amikasin, aminoaçil transfer RNA'nın (tRNA) bağlanma bölgesi olan bakteriyel ribozomun küçük alt birimindeki A bölgesini hedefleyerek bakteriyel translasyonu etkiler ve bu şekilde bakterisidal aktivite gösterir (164). Amikasin NTM türlerine özellikle *M. abscessus* komplekse karşı iyi bir antimikobakteriyel aktiviteye sahiptir ve *M. abscessus* enfeksiyonlarının tedavisinde en etkili parenteral antibiyotiklerden biri olarak kabul edilmektedir (165). Ancak *M. abscessus* kompleks suşları, 16S rRNA (*rrs*) ve 30S ribozomal protein S12 (*RpsL*) hedef bölgelerinin mutasyonu, *eis2* geninin kodladığı aminoglikozit modifiye eden enzim ile ilacın modifikasyonu, artmış dışa atım ve azalmış içeri alım mekanizmaları ile amikasine direnç geliştirebilmektedir (163).

Literatürde çeşitli çalışmalarda *M. abscessus* kompleks suşlarının amikasin duyarlılık oranları rapor edilmektedir ve bu çalışmaların bir kısmında da amikasine direnç bildirilmiştir. Aono ve ark. çalışmalarında, 85 *M. abscessus* kompleks suşunun 24'ünü (%28,2) amikasine duyarlı, 57'sini (%67,1) orta duyarlı, 4'ünü (%4,7) dirençli; bu suşların içinden 48 *M. abscessus* alt tür *abscessus* suşunun da 10'unu (%20,8) duyarlı, 35'ini (%72,9) orta duyarlı, 3'ünü (%6,3) dirençli tespit etmişlerdir (159). Wu ve ark., 194 *M. abscessus* klinik izolatının 188'ini (%96,91) amikasine duyarlı, 1'ini orta duyarlı, 5'ini (%2,58) dirençli rapor etmişlerdir (163). Shen ve ark., 20 *M. abscessus* izolatının 9'unu (%45) amikasine duyarlı, 9'unu (%45) orta duyarlı, 2'sini (%10) dirençli saptamışlardır (158). Chua ve ark. çalışmalarında, 20 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 19'unu (%95) amikasine duyarlı, 1'ini dirençli rapor etmişlerdir (166). Kobayashi ve ark. ise 30 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 29'unu (%96,67) amikasine duyarlı, 1'ini (%3,3) orta duyarlı tespit etmişlerdir (167). Ek olarak, Hatakeyama ve ark., çalışmalarındaki 13 (%100); Pang ve ark. çalışmalarındaki 55(%100); Sriram ve Sarangan çalışmalarındaki 64 (%100) *M. abscessus* kompleks suşunun tamamının amikasine duyarlı olduğunu, suşlarında direnç saptamadıklarını bildirmişlerdir (168-170). Çalışmamızda da 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 48'i (%87,3) amikasine duyarlı, 4'ü (%7,3) orta duyarlı, 3'ü (%5,4) dirençli tespit edilmiştir. Amikasin için saptanan yüksek duyarlılık ve düşük direnç oranımız literatür ile uyumlu bulunmuştur.



CLSI M24 rehberinin duyarlılığının test edilmesini önerdiği, *M. abscessus* kompleks enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan diğer bir aminoglikozit antibiyotik de tobramisin'dir. Tobramisin bakteriyel ribozomun 30S altbirimine geri dönüşsüz bağlanıp 70S başlangıç kompleksinin oluşmasını engelleyerek protein sentezini inhibe eden bakterisidal bir antimikrobiyal ajandır (166, 171). Çeşitli çalışmalarda *M. abscessus* izolatlarının tobramisin duyarlılığı araştırılmış ve tobramisin direnci rapor edilmiştir. Prammananan ve ark. da *M. abscessus* izolatlarındaki tobramisin direncinin 16S rRNA'da 1408. pozisyonundaki adenin bazının guanin ile yer değiştirmesine neden olan spontan bir tek nokta mutasyonu ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (152).

Literatürdeki duyarlılık çalışmalarının çoğunluğunda *M. abscessus* izolatlarında tobramisine yüksek direnç oranları bildirilmiştir. Aono ve ark. 48 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının tümünü; Hatakeyama ve ark. 13 *M. abscessus* kompleks izolatının tümünü (%100) tobramisine dirençli tespit etmişlerdir (168, 172). Shen ve ark. 20 *M. abscessus* izolatının 12'sini (%60) tobramisine dirençli, 3'ünü (%15) tobramisine orta duyarlı, 5'ini (%25) tobramisine duyarlı bulmuşlardır (158). Chua ve ark. da çalışmalarında 20 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 14'ünü (%70) tobramisine orta duyarlı, 6'sını (%30) tobramisine dirençli tespit etmişlerdir (166). Çalışmamızda da 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 10'u (%18,2) tobramisine duyarlı, 28'i (%58,9) tobramisine orta duyarlı, 17'si (%30,9) tobramisine dirençli saptanmıştır. Direnç oranlarımız, Chua ve ark. çalışması ile benzer bulunmuş ve literatürdeki bazı çalışmalara göre tobramisine direnç oranımız daha düşük tespit edilmiştir.

*M. abscessus* kompleks enfeksiyonlarının kombine antimikrobiyal tedavisindeki önemli beta laktam grubu antibiyotiklerde sefoksitin ve imipenemdir. Sefoksitin ve imipenem bakterinin hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösteren bir antimikrobiyallerdir (142). Sefoksitin ve imipenem *M. abscessus* enfeksiyonlarının kombine tedavisinde intravenöz olarak kullanılan orta etkili ajanlardır (173). *M. abscessus* kompleks beta laktamaz enzimleri ile antibiyotikleri degrades ederek beta laktam grubu bu antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olabilir (6).

*M. abscessus* suşlarının imipenem ve sefoksitin için duyarlılıkları çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Aono ve ark. çalışmalarında, 48 *M. abscessus* alt tür *abscessus* suşunun 8'ini (%16,67) sefoksitine dirençli, 38'ini (%79,17) sefoksitine orta duyarlı, 2'sini (%4,17) sefoksitine duyarlı; 41'ini (%85,42) imipeneme dirençli, 7'sini (%14,58) imipeneme orta duyarlı olarak tespit etmişlerdir (159). Hatakeyama ve ark. çalışmalarındaki 13 *M. abscessus* kompleks izolatının 4'ünü (%30,77) imipeneme duyarlı, 9'unu (%69,23) orta duyarlı saptanmışlar ve imipeneme direnç saptamamışlardır (168). Shen ve arkadaşları çalışmalarında 20 *M. abscessus* izolatının 2'sini (%10) sefoksitine dirençli, 10'unu (%50) sefoksitine orta duyarlı, 8'ini (%40) sefoksitine duyarlı ve bu izolatların 13'ünü (%65) imipeneme dirençli, 2'sini (%10) imipeneme orta duyarlı, 5'ini (%25) imipeneme duyarlı tespit etmişlerdir (158). Chua ve ark. da 20 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 18'ini (%90) sefoksitine orta duyarlı, 2'sini (%10) sefoksitine dirençli saptarken 6'sını (%30) imipeneme orta duyarlı, 14'ünü (%70) imipeneme dirençli bulmuşlardır (166). Sriram ve ark. ise 64 *M. abscessus* izolatının 43'ünü (%77,2) sefoksitine dirençli, 21'ini (%22,8) sefoksitine duyarlı; 22'sini (%34,3) imipeneme dirençli, 32'sini (%50) imipeneme orta duyarlı, 8'ini (%12,5) imipeneme duyarlı rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 30'u (%54,6) sefoksitine duyarlı, 21'i (%38,2) sefoksitine orta duyarlı, 4'ü (%7,2) sefoksitine dirençli ve izolatlarımızın 3'ü (%5,4) imipeneme duyarlı, 30'u (%54,6) imipeneme orta duyarlı, 22'si (%40) imipeneme dirençli tespit edilmiştir. İzolatlarımızın sefoksitin duyarlılık oranları literatürdeki bazı çalışmalarla uyumlu bulunurken, duyarlılık oranlarımız bazı çalışmalara göre daha yüksek bulunmuştur. İmipenem direnç oranlarımız ise literatürdeki çalışmalarla uyumlu bulunmuş ancak imipeneme orta duyarlılık oranları literatürdeki bazı çalışmalarda bildirilen oranlara göre daha yüksek tespit edilmiştir.

Florokinolonlar özellikle siprofloksasin ve moksifloksasin duyarlılık testi sonuçlarına göre *M. abscessus* kompleks enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilen diğer bir grup antimikrobiyal ajanlardır. Florokinolonlar, primer hedefi bakteriyel DNA giraz enzimine bağlanarak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu engelleyerek etki ederler (174). Mikobakterilerde dışa atım pompaları ve ilacın hedefi DNA giraz enzimidaki mutasyonlar ile florokinolon grubu antimikrobiyallere direnç geliştirmektedir (175). *M. abscessus* izolatlarında siprofloksasin direnç

mekanizmasının araştırıldığı çeşitli çalışmalarda bu izolatlarda siprofloksasin direncine DNA giraz enziminin *gyrA* alt biriminin kinolon direncini tanımlayan bölgedeki (quinolone resistance determining regions, QRDR) tek nokta mutasyonunun neden olduğu bildirilmiştir (176, 177). Literatürde *M. abscessus* izolatlarında moksifloksasin direnç mekanizması hakkında ise bu izolatlarda moksifloksasin direncinin *gyrA* ve *gyrB* mutasyonu ile ilişkili olmadığı, QRDR dışında bir bölgede mutasyon olabileceği veya farklı bir direnç mekanizmasına sahip olabileceği bildirilmiştir (178).

*M. abscessus* kompleks için duyarlılığı test edilmesi önerilen florokinolon grubu antimikrobiyal ajanlar siprofloksasin ve moksifloksasin için *M. abscessus* izolatlarının duyarlılık profilleri literatürde çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır ve yüksek direnç oranları bildirilmiştir (158, 159, 166, 168, 169). Hatakeyama ve ark. çalışmalarındaki 13 *M. abscessus* kompleks izolatının tümünü (%100) siprofloksasine dirençli, 12'sini (%92,3) moksifloksasine dirençli saptamışlardır (168). Shen ve ark. 20 *M. abscessus* kompleks izolatının 19'unu (%95) siprofloksasine ve moksifloksasine dirençli, 1'ini (%5) siprofloksasin ve moksifloksasine duyarlı tespit etmişlerdir (158). Chua ve ark. da çalışmalarında 20 *M. abscessus* alt tür *abscessus* tümünü (%100) siprofloksasine, 19'unu (%95) moksifloksasine dirençli saptamışlardır (166). Çalışmamızda da 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 45'i (%81,9) siprofloksasine dirençli, 8'i (%14,5) orta duyarlı, 2'si (%3,6) duyarlı ve bu 55 izolatın 16'sı (%29,1) moksifloksasine dirençli, 12'si (%21,8) orta duyarlı, 27'si (%49,1) duyarlı tespit edilmiştir. *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarımızın siprofloksasin direnç oranları literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak yüksek bulunmuştur. Moksifloksasin direnç oranlarımızın ise literatürdeki çalışmalara göre daha düşük, duyarlılık oranlarımızın daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Choi ve ark. ve Kim ve ark. da çalışmamızın moksifloksasin duyarlılık oranlarına benzer sonuçlar saptamışlardır. Choi ve ark. 32 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 9'unu (%28,1) moksifloksasine orta duyarlı, 23'ünü (%71,9) duyarlı; Kim ve ark. ise 33 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 7'sini (%21,2) moksifloksasine orta duyarlı 24'ünü (%72,7) duyarlı tespit etmişlerdir (179, 180). Ayrıca çalışmamızda *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarında siprofloksasin direnci moksifloksasin direncinden daha yüksek saptanmıştır. Literatürde de TDM'lerin siprofloksasin gibi 2.

nesil florokinolonlara dirençli iken, moksifloksasin gibi 4. nesil florokinolonlara daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (181, 182).

*M. abscessus* kompleks enfeksiyonlarının tedavisindeki temel ilaçlardan biri olan klaritromisin, ribozomun 50S ribozomal alt birimine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek etki göstermektedir (183). Ancak *M. abscessus* kompleks kazanılmış ve indüklenebilir direnç mekanizması ile klaritromisine direnç geliştirebilmektedir (131, 155). Kazanılmış klaritromisin direnci, 23S rRNA *rrl* geninin A2058 ve A2059 konumlarındaki nokta mutasyonları ile ilişkilidir (155). İndüklenebilir klaritromisin direnci ise *erm(41)* geninin 28. pozisyonundaki C-T tek nükleotid polimorfizi (*single nucleotide polymorphism*, SNP) sonucu fonksiyonel *erm(41)* geni ile ilişkilidir (131). Konstitütif direnç in vitro antibiyotik duyarlılık testinin 3. gününde yüksek klaritromisin MİK değerleri ile karakterize iken, *erm(41)* geni ile ilişkili indüklenebilir direnç in vitro antibiyotik duyarlılık testinin 14. günündeki dirençli MİK değerleri ile karakterizedir (11, 155, 184).

Literatürde çeşitli çalışmalarda *M. abscessus* kompleks izolatlarının klaritromisin direnç oranları ve direnç mekanizmaları araştırılmıştır. Hatakeyama ve ark. 13 *M. abscessus* kompleks izolatının 8'ini (%61,5) klaritromisine duyarlı, 1'ini (%7,7) orta duyarlı, 4'ünü (%30,8) klaritromisine dirençli saptamışlardır (168). Shen ve ark. çalışmalarında, 20 *M. abscessus* kompleks izolatının klaritromisin duyarlılık testinde 3 günlük inkübasyon sonucunda izolatların 4'ünü (%20) dirençli, 16'sını (%80) duyarlı; 14 günlük inkübasyon sonucunda ise 7'sini (%35) dirençli, 13'ünü (%65) duyarlı bulmuşlardır (158). Lee ve ark. 157 *M. abscessus* kompleks klinik izolatının 17'sini (%10,83) klaritromisine duyarlı, 35'ini (%22,29) klaritromisine dirençli, 105'ini (%66,8) indüklenebilir klaritromisin dirençli saptamışlardır (185). Aono ve ark. çalışmalarında, 48 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 2'sini (%4,2) klaritromisine duyarlı, 1'ini (%2,1) klaritromisine orta duyarlı, 45'ini (%93,8) klaritromisine dirençli tespit etmişlerdir (172). Chua ve ark. 14 gün inkübasyon sonucunda çalışmalarındaki 20 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının 3'ünü (%15) klaritromisine duyarlı, 17'sini (%85) klaritromisine dirençli bulmuşlardır (166). Çalışmamızda da 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının klaritromisin duyarlılık testinde 3 günlük inkübasyon sonucunda izolatların 38'i (%69,1) duyarlı, 2'si (%3,6) orta duyarlı, 15'i (%27,3) dirençli; 14 günlük inkübasyon sonucunda ise 7'si (%12,7)

duyarlı, 48'i dirençli (%87,3) dirençli bulunmuştur. Ek olarak, *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarımızın 33'ünde (%60) indüklenebilir klaritromisin direnci tespit edilmiştir. Klaritromisin duyarlılık testi sonucundaki duyarlılık ve direnç oranlarımız literatürdeki *M. abscessus* alt tür *abscessus* çalışmalarının sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Ancak *M. abscessus* kompleks izolatları ile yapılan çalışmalarda duyarlılık ve direnç oranlarına göre farklılıklar vardır. Oranlardaki bu farklılıkların nedeni de çalışmalara *M. abscessus* kompleks içinde yer alan *M. abscessus* alt tür *abscessus*'tan farklı klaritromisin duyarlılık profiline sahip *M. abscessus* alt tür *massiliense* ve *M. abscessus* alt tür *bolletii* alt türlerinin dahil edilmiş olması olabilir.

Çalışmamızda fenotipik duyarlılık testlerine ek olarak *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarının klaritromisin direnci ve indüklenebilir klaritromisin direnci gerçek zamanlı PZR yöntemi ile erime eğrisi analizi yapılarak moleküler olarak araştırılmıştır. Klaritromisin direnci için yabancı tip *rrl* ve mutasyona uğramış *rrl'e ait*; indüklenebilir klaritromisin direnci için *erm(41)-C28* ve *erm(41)-T28'e ait* erime eğrileri analiz edilmiştir. PZR deneylerimiz sonucunda, indüklenebilir dirençli 33 izolatın 28'inde (%84,85) 91,5°C'de *erm(41)* geninde tek nükleotit polimorfizmi sonucu ortaya çıkan fonksiyonel *erm(41)-T28* genine ait erime eğrisi, duyarlı 7 izolatın tamamında (%100) ise 92°C'de fonksiyonel olmayan *erm(41)-C28* genine ait erime eğrisi tespit edilmiştir. Dirençli 15 izolatın 13'ünde (%86,67) ise *rrl* A2058/A2059 mutasyonuna ait erime eğrisi saptanmıştır. Mutant ve yabancı tipe ait erime eğrisi sıcaklıkları arasındaki fark 0,5°C olarak tespit edilmiştir. Erime eğrisi sıcaklıkları arasındaki farkın küçük olması erime eğrilerinin ayrımını zorlaştırmaktadır. Literatürde de klaritromisin direnci çeşitli çalışmalarda moleküler yöntemlerle araştırılmış ve duyarlı *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarında fonksiyonel olmayan *erm(41)-C28* ve yabancı tip *rrl* geni, dirençli izolatlarda fonksiyonel olmayan *erm(41)-C28* ile birlikte *rrl* A2058G mutasyonu veya fonksiyonel *erm(41)-T28* ile birlikte *rrl* A2059G mutasyonu ve indüklenebilir dirençli izolatlarda ise fonksiyonel *erm(41)-T28* ile birlikte yabancı tip *rrl* geni tespit edildiği rapor edilmiştir (155, 185-189). Antibiyotik duyarlılık testi ile fenotipik olarak klaritromisin duyarlılık profili belirlenen *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarımızın *erm(41)* ve *rrl* için yapılan PZR sonuçları duyarlılık profilleri ile uyumlu bulunmuştur. PZR sonuçlarımız

literatürdeki klaritromisin direncinin moleküler olarak araştırıldığı çalışmaların sonuçları ile de uyumlu bulunmuştur.

Gerçek zamanlı PZR yöntemi bu izolatlarda indüklenebilir direncin daha kısa sürede hızlı saptanması açısından faydalı olabilir ancak prob tabanlı gerçek zamanlı PZR, yüksek çözünürlüklü erime eğrisi yöntemi ve moleküler dizileme yöntemi gibi yöntemlerle doğrulanması gereklidir (185, 190). Mutant izolatlarda tek nükleotit kaynaklı bir farklılık olduğundan erime eğrisi analizinde erime sıcaklıkları birbirine yakın olabileceğinden ayırım yapmak zorlaşabilmektedir bu nedenle bu analizlerde daha yüksek çözünürlüklü cihazlar ve prob tabanlı gerçek zamanlı PZR tekniklerinin kullanılması daha yararlı olabilir (185).

Sonuç olarak, *M. abscessus* alt tür *abscessus* birçok antimikrobiyal ajana dirençli bir patojendir ve direnç nedeniyle neden olduğu enfeksiyonların tedavisi zordur. *M. abscessus* alt tür *abscessus* enfeksiyonlarının etkili antimikrobiyal tedavi rejiminin belirlenmesinde, izolatin referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması ve duyarlılık profilinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Literatürde özellikle *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarının duyarlılık profilleri ile ilgili Japonya, Çin ve Avustralya gibi farklı ülkelerde izole edilen izolatlara ait oranları içeren çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Türkiye’de yapılan çalışmalarda *M. abscessus* kompleks duyarlılık sonuçları bildirilmiştir (191); ancak *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatlarına ait duyarlılık sonuçlarına bildiğimiz, bulabildiğimiz kadarıyla rastlanmamıştır. Çalışmamızda Türkiye’de izole edilmiş, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı’nda ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tüberküloz Epidemiyolojisi Laboratuvarı’nda üretilen ve tanımlanan 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatinin antimikrobiyal duyarlılık profilleri referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile belirlenmiştir. Ek olarak, bu izolatlarımızda klaritromisin direnci hem antibiyotik duyarlılık testleri ile fenotipik olarak hem de gerçek zamanlı PZR yöntemi ile moleküler olarak gösterilmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tüberküloz Epidemiyolojisi Laboratuvarı'nda üretilen 55 *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının klaritromisin, amikasin, imipenem, sefoksitin, siprofloksasin, moksifloksasin ve tobramisin duyarlılıkları CLSI M24 önerileri doğrultusunda referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile belirlenmiştir.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri sonucunda izolatlarımızın en duyarlı olduğu antibiyotik amikasin, en dirençli olduğu ise klaritromisin olarak saptanmıştır. Duyarlılık testlerinde klaritromisin için inkübasyon süresi 14 güne uzatılmış ve 33 duyarlı izolatın 14 günlük inkübasyon sonunda indüklenebilir dirençli olduğu saptanmıştır. Referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile izolatların antimikrobiyal duyarlılık profillerinin belirlenmesi önemlidir çünkü bu veriler izolatların neden oldukları enfeksiyonların tedavisinde etkili rejimin belirlenmesinde yol gösterici olmaktadır.

Elli beş *M. abscessus* alt tür *abscessus* izolatının klaritromisin direnci hem antibiyotik duyarlılık testleri ile fenotipik olarak hem de gerçek zamanlı PZR yöntemi ile moleküler olarak araştırılmıştır. İndüklenebilir klaritromisin direnci referans yöntem ile 14 günde saptanabilmektedir. Direnci 2-3 saat gibi bir sürede daha hızlı saptayabilmek amacı ile Syber green tabanlı gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak erime eğrisi analizi yapılmıştır. Bu yöntem indüklenebilir direnci tespit etmede tek başına yeterli bulunmamıştır, moleküler dizileme yöntemi gibi yöntemlerle farklı yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir. Yabani tip gen ile mutant gen arasında tek nükleotit kaynaklı bir farklılık olduğundan erime eğrisi analizinde erime sıcaklıkları birbirine yakın olmakta ve bu da Syber green ile yapılan gerçek zamanlı PZR deneylerinde erime eğrisi analizi ile ayrımı zorlaştırmaktadır. Prob tabanlı gerçek zamanlı PZR yöntemi, yüksek çözünürlüklü erime eğrisi yöntemi ve daha yüksek çözünürlüklü cihazlar ile analizlerin yapılması direncin tespitinde daha hassas ve daha faydalı olabilir. Ancak direncin saptanmasında moleküler yöntemlere ek olarak referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile de fenotipik olarak direncin tespit edilmesi önemlidir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Holland SM. Nontuberculous mycobacteria. *The American journal of the medical sciences*. 2001;321(1):49-55.
2. Tortoli E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009;15(10):906-10.
3. Gupta RS, Lo B, Son J. 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;9:67.
4. Shulha JA, Escalante P, Wilson JW, editors. *Pharmacotherapy Approaches in Nontuberculous Mycobacteria Infections*. Mayo Clinic Proceedings; 2019: Elsevier.
5. Lee M-R, Sheng W-H, Hung C-C, Yu C-J, Lee L-N, Hsueh P-R. *Mycobacterium abscessus* complex infections in humans. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(9):1638.
6. Nessar R, Cambau E, Reytrat JM, Murray A, Gicquel B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(4):810-8.
7. Sassi M, Drancourt M. Genome analysis reveals three genomospecies in *Mycobacterium abscessus*. *BMC genomics*. 2014;15(1):359.
8. Benwill JL, Wallace RJ, Jr. *Mycobacterium abscessus*: challenges in diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis*. 2014;27(6):506-10.
9. Koh WJ, Jeon K, Lee NY, Kim BJ, Kook YH, Lee SH, et al. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(3):405-10.
10. Harris KA, Kenna DT. *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis: molecular typing and clinical outcomes. *J Med Microbiol*. 2014;63(Pt 10):1241-6.
11. Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G, et al. *CLSI Standards: Guidelines for Health Care Excellence. M24: Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes*. 3rd ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
12. Luo RF, Curry C, Taylor N, Budvytiene I, Banaei N. Rapid Detection of Acquired and Inducible Clarithromycin Resistance in *Mycobacterium abscessus* Group by a Simple Real-Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53(7):2337-9.
13. Hansen GA. *Undersøgelser angående spedalskhedens årsager*. *Norsk Magazin Laegevidenskaben*. 1874;4:1-88.
14. Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(3):196-201.
15. Thorel MF, Huchzermeyer H, Weiss R, Fontaine JJ. *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet Res*. 1997;28(5):439-47.
16. Percival SL, Williams DW. *Mycobacterium*. *Microbiology of Waterborne Diseases*: Elsevier; 2014. p. 177-207.
17. Fregnan G, Smith D. Description of various colony forms of mycobacteria. *Journal of bacteriology*. 1962;83(4):819-27.
18. Jackson M. The mycobacterial cell envelope—lipids. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(10):a021105.
19. Dulberger CL, Rubin EJ, Boutte CC. The mycobacterial cell envelope—a moving target. *Nature Reviews Microbiology*. 2019:1-13.



20. Köksal F, Yaman A. Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı. 21. Yüz yılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. 2003:35-42.
21. Medjahed H, Gaillard J-L, Reyrat J-M. Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field. Trends in microbiology. 2010;18(3):117-23.
22. Alderwick LJ, Harrison J, Lloyd GS, Birch HL. The Mycobacterial cell wall—peptidoglycan and Arabinogalactan. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015;5(8):a021113.
23. Marrakchi H, Lanéelle M-A, Daffé M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. Chemistry & biology. 2014;21(1):67-85.
24. Trifiro S, Bourgault A-M, Lebel F, Rene P. Ghost mycobacteria on Gram stain. Journal of clinical microbiology. 1990;28(1):146-7.
25. Chen P, Shi M, Feng G-D, Liu J-Y, Wang B-J, Shi X-D, et al. A highly efficient Ziehl-Neelsen stain: identifying de novo intracellular Mycobacterium tuberculosis and improving detection of extracellular M. tuberculosis in cerebrospinal fluid. Journal of clinical microbiology. 2012;50(4):1166-70.
26. Gao B, Gupta RS. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2012;76(1):66-112.
27. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson M-C, Salfinger M, et al. Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: mycobacteria. Clinical microbiology reviews. 2018;31(2):e00038-17.
28. Forbes BA. Mycobacterial taxonomy. Journal of clinical microbiology. 2016;JCM. 01287-16.
29. Tsukamura M. Identification of mycobacteria. Tubercle. 1967;48(4):311-38.
30. Brosch R, Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the leprosy and tubercle bacilli. Research in microbiology. 2000;151(2):135-42.
31. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties. 2001;20(1):21-54.
32. Prasanna AN, Mehra S. Comparative phylogenomics of pathogenic and non-pathogenic mycobacterium. PLoS One. 2013;8(8):e71248.
33. Rojas-Espinosa O, Lovik M. Mycobacterium leprae and Mycobacterium lepraemurium infections in domestic and wild animals. Rev Sci Tech. 2001;20(1):219-51.
34. Walsh DS, Portaels F, Meyers WM. Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans infection). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2008;102(10):969-78.
35. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, 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):367-416.
36. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Medical Clinics of North America. 1959;43(1):273-90.
37. Turenne CY. Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution. Infection, Genetics and Evolution. 2019.
38. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus Mycobacterium. Clinical microbiology reviews. 2014;27(4):727-52.
39. Smith DS, Lindholm-Levy P, Huitt GA, Heifets LB, Cook JL. Mycobacterium terrae: case reports, literature review, and in vitro antibiotic susceptibility testing. Clinical infectious diseases. 2000;30(3):444-53.

40. Simmon KE, Brown-Elliott BA, Ridge PG, Durtschi JD, Mann LB, Slechta ES, et al. *Mycobacterium chelonae-abscessus* complex associated with sinopulmonary disease, Northeastern USA. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(9):1692.
41. Ngeow YF, Wong YL, Tan JL, Hong KW, Ng HF, Ong BL, et al. Identification of new genomospecies in the *Mycobacterium terrae* complex. *PLoS One*. 2015;10(4):e0120789.
42. Parte AC. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic acids research*. 2013;42(D1):D613-D6.
43. Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(4):716-46.
44. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PloS one*. 2009;4(6):e5660.
45. Delogu G, Sali M, Fadda G. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2013;5(1).
46. Kiazzyk S, Ball TB. Latent tuberculosis infection: An overview. *Can Commun Dis Rep*. 2017;43(3-4):62-6.
47. Vernon A, editor *Treatment of latent tuberculosis infection*. *Seminars in respiratory and critical care medicine*; 2013: Thieme Medical Publishers.
48. Matteelli A, Sulis G, Capone S, D'Ambrosio L, Migliori GB, Getahun H. Tuberculosis elimination and the challenge of latent tuberculosis. *Presse Med*. 2017;46(2 Pt 2):e13-e21.
49. Organization WH. *Global tuberculosis report 2019*. Geneva; 2019. Report No.: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
50. Buhler VB, Pollak A. Human infection with atypical acid-fast organisms; report of two cases with pathologic findings. *Am J Clin Pathol*. 1953;23(4):363-74.
51. Sharma P, Singh D, Sharma K, Verma S, Mahajan S, Kanga A. Are We Neglecting Nontuberculous Mycobacteria Just as Laboratory Contaminants? Time to Reevaluate Things. *J Pathog*. 2018;2018:8907629.
52. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:29-63.
53. Falkinham JO, 3rd. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol*. 2009;107(2):356-67.
54. Fedrizzi T, Meehan CJ, Grottola A, Giacobazzi E, Fregni Serpini G, Tagliazucchi S, et al. Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. *Sci Rep*. 2017;7:45258.
55. Mortazavi Z, Bahrmand A, Sakhaee F, Doust RH, Vaziri F, Siadat SD, et al. Evaluating the clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory samples in Iran: an often overlooked disease. *Infect Drug Resist*. 2019;12:1917-27.
56. Misch EA, Saddler C, Davis JM. Skin and Soft Tissue Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria. *Curr Infect Dis Rep*. 2018;20(4):6.
57. Wagner D, Young LS. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. *Infection*. 2004;32(5):257-70.
58. Wu UI, Holland SM. Host susceptibility to non-tuberculous mycobacterial infections. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(8):968-80.
59. Xu J, Li P, Zheng S, Shu W, Pang Y. Prevalence and risk factors of pulmonary nontuberculous mycobacterial infections in the Zhejiang Province of China. *Epidemiol Infect*. 2019;147:e269.
60. Ryu YJ, Koh WJ, Daley CL. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2016;79(2):74-84.
61. Piersimoni C, Scarparo C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1351-8; quiz 544.

62. Petitjean G, Fluckiger U, Scharen S, Laifer G. Vertebral osteomyelitis caused by non-tuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(11):951-3.
63. Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Mootsikapun P, Assanasen S, Chaiwarith R, Anunnatsiri S. Disseminated nontuberculous mycobacterial infection in patients who are not infected with HIV in Thailand. *Clin Infect Dis.* 2007;45(4):421-7.
64. Lee TL, Agrawal R, Tan JY, Ong KH, Wong CS, Ho SL. Disseminated nontuberculous mycobacterial infection with multifocal retinitis and vasculitis in an immunocompromised patient with anti-IFN- autoantibodies. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2016;6(1):39.
65. Kobayashi T, Nishijima T, Teruya K, Aoki T, Kikuchi Y, Oka S, et al. High Mortality of Disseminated Non-Tuberculous Mycobacterial Infection in HIV-Infected Patients in the Antiretroviral Therapy Era. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151682.
66. Genc GE, Demir M, Yaman G, Kayar B, Koksall F, Satana D. Evaluation of MALDI-TOF MS for identification of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens in mycobacteria growth indicator tube medium. *New Microbiol.* 2018;41(3):214-9.
67. Falkinham JO, 3rd. Current Epidemiologic Trends of the Nontuberculous Mycobacteria (NTM). *Curr Environ Health Rep.* 2016;3(2):161-7.
68. Maurya A, Nag V, Kant S, Sharma A, Gadepalli R, Kushwaha R. Recent methods for diagnosis of nontuberculous mycobacteria infections: Relevance in clinical practice. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ).* 2017;1(1):14-8.
69. Bhalla GS, Sarao MS, Kalra D, Bandyopadhyay K, John AR. Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria. *Pract Lab Med.* 2018;12:e00107.
70. Ceysens PJ, Soetaert K, Timke M, Van den Bossche A, Sparbier K, De Cremer K, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Combined Species Identification and Drug Sensitivity Testing in Mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2017;55(2):624-34.
71. van Belkum A, Welker M, Pincus D, Charrier JP, Girard V. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are the Current Issues? *Ann Lab Med.* 2017;37(6):475-83.
72. Moore M, Frerichs JB. An Unusual Acid-Fast Infection of the Knee with Subcutaneous, Abscess-Like Lesions of the Gluteal Region: Report of a Case with a Study of the Organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. *Journal of Investigative Dermatology.* 1953;20(2):133-69.
73. Leao SC, Tortoli E, Euzéby JP, Garcia MJ. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 2011;61(9):2311-3.
74. Conville PS, Witebsky FG. Variables affecting results of sodium chloride tolerance test for identification of rapidly growing mycobacteria. *Journal of clinical microbiology.* 1998;36(6):1555-9.
75. Lopeman RC, Harrison J, Desai M, Cox JA. *Mycobacterium abscessus*: environmental bacterium turned clinical nightmare. *Microorganisms.* 2019;7(3):90.
76. Silcox VA, Good RC, Floyd MM. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 1981;14(6):686-91.
77. Wilson RW, Steingrube VA, Böttger EC, Springer B, Brown-Elliott BA, Vincent V, et al. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2001;51(5):1751-64.
78. Costa-Alcalde JJ, Barbeito-Castiñeiras G, González-Alba JM, Aguilera A, Galán JC, Pérez-del-Molino ML. Comparative evaluation of the identification of rapidly growing non-

tuberculous mycobacteria by mass spectrometry (MALDI-TOF MS), GenoType Mycobacterium CM/AS assay and partial sequencing of the *rpoB* gene with phylogenetic analysis as a reference method. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (English ed). 2019;37(3):160-6.

79. Adekambi T, Drancourt M, Raoult D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol.* 2009;17(1):37-45.

80. Nasiri MJ, Shahraki AH, Fooladi AAI, Dabiri H, Feizabadi MM. *rpoB* gene sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Archives of Pediatric Infectious Diseases.* 2017;5(2).

81. Macheras E, Roux A-L, Bastian S, Leão SC, Palaci M, Sivadon-Tardy V, et al. Multilocus sequence analysis and *rpoB* sequencing of *Mycobacterium abscessus* (sensu lato) strains. *Journal of clinical microbiology.* 2011;49(2):491-9.

82. Teng S-H, Chen C-M, Lee M-R, Lee T-F, Chien K-Y, Teng L-J, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry can accurately differentiate between *Mycobacterium masillense* (*M. abscessus* subspecies *bolletti*) and *M. abscessus* (sensu stricto). *Journal of clinical microbiology.* 2013;51(9):3113-6.

83. Fangous M-S, Mougari F, Gouriou S, Calvez E, Raskine L, Cambau E, et al. Classification algorithm for subspecies identification within the *Mycobacterium abscessus* species, based on matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology.* 2014;52(9):3362-9.

84. Byrd TF, Ryan K. *Mycobacterium abscessus*: shapeshifter of the mycobacterial world. *Frontiers in microbiology.* 2018;9:2642.

85. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, Foweraker J, Roddick I, Inns T, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *The Lancet.* 2013;381(9877):1551-60.

86. Clary G, Sasindran SJ, Nesbitt N, Mason L, Cole S, Azad A, et al. *Mycobacterium abscessus* smooth and rough morphotypes form antimicrobial-tolerant biofilm phenotypes but are killed by acetic acid. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2018;62(3):e01782-17.

87. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical microbiology reviews.* 2004;17(1):98-106.

88. Bendinger B, Rijnaarts HH, Altendorf K, Zehnder AJ. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(11):3973-7.

89. Caverly LJ, Caceres SM, Fratelli C, Happoldt C, Kidwell KM, Malcolm KC, et al. *Mycobacterium abscessus* morphotype comparison in a murine model. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117657.

90. Howard ST, Rhoades E, Recht J, Pang X, Alsup A, Kolter R, et al. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology.* 2006;152(6):1581-90.

91. Roux A-L, Viljoen A, Bah A, Simeone R, Bernut A, Laencina L, et al. The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open biology.* 2016;6(11):160185.

92. Gutiérrez AV, Viljoen A, Ghigo E, Herrmann J-L, Kremer L. Glycopeptidolipids, a double-edged sword of the *Mycobacterium abscessus* complex. *Frontiers in microbiology.* 2018;9.

93. Pawlik A, Garnier G, Orgeur M, Tong P, Lohan A, Le Chevalier F, et al. Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent *Mycobacterium abscessus*. *Molecular microbiology.* 2013;90(3):612-29.

94. Rhoades ER, Archambault AS, Greendyke R, Hsu F-F, Streeter C, Byrd TF. Mycobacterium abscessus glycopeptidolipids mask underlying cell wall phosphatidyl-myoinositol mannosides blocking induction of human macrophage TNF- $\alpha$  by preventing interaction with TLR2. *The Journal of Immunology*. 2009;183(3):1997-2007.
95. Llorens-Fons M, Perez-Trujillo M, Julian E, Brambilla C, Alcaide F, Byrd TF, et al. Trehalose Polyphleates, External Cell Wall Lipids in Mycobacterium abscessus, Are Associated with the Formation of Clumps with Cording Morphology, Which Have Been Associated with Virulence. *Front Microbiol*. 2017;8:1402.
96. Chan ED, Bai X, Kartalija M, Orme IM, Ordway DJ. Host immune response to rapidly growing mycobacteria, an emerging cause of chronic lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;43(4):387-93.
97. Bernut A, Viljoen A, Dupont C, Sapriel G, Blaise M, Bouchier C, et al. Insights into the smooth-to-rough transitioning in Mycobacterium boletii unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Molecular microbiology*. 2016;99(5):866-83.
98. Dubois V, Viljoen A, Laencina L, Le Moigne V, Bernut A, Dubar F, et al. MmpL8MAB controls Mycobacterium abscessus virulence and production of a previously unknown glycolipid family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(43):E10147-e56.
99. Catherinot E, Roux AL, Macheras E, Hubert D, Matmar M, Dannhoffer L, et al. Acute respiratory failure involving an R variant of Mycobacterium abscessus. *J Clin Microbiol*. 2009;47(1):271-4.
100. Jonsson BE, Gilljam M, Lindblad A, Ridell M, Wold AE, Welinder-Olsson C. Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1497-504.
101. Lee M-R, Yang C-Y, Chang K-P, Keng L-T, Yen DH-T, Wang J-Y, et al. Factors associated with lung function decline in patients with non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease. *PLoS One*. 2013;8(3):e58214.
102. Viviani L, Harrison MJ, Zolin A, Haworth CS, Floto RA. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF). *Journal of Cystic Fibrosis*. 2016;15(5):619-23.
103. Kothavade R, Dhurat R, Mishra S, Kothavade U. Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2013;32(2):161-88.
104. Lin S-S, Lee C-C, Jang T-N. Soft tissue infection caused by rapid growing mycobacterium following medical procedures: two case reports and literature review. *Annals of dermatology*. 2014;26(2):236-40.
105. Uslan DZ, Kowalski TJ, Wengenack NL, Virk A, Wilson JW. Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria: comparison of clinical features, treatment, and susceptibility. *Archives of dermatology*. 2006;142(10):1287-92.
106. Jeong SH, Kim S-Y, Huh HJ, Ki C-S, Lee NY, Kang C-I, et al. Mycobacteriological characteristics and treatment outcomes in extrapulmonary Mycobacterium abscessus complex infections. *International Journal of Infectious Diseases*. 2017;60:49-56.
107. Talati NJ, Rouphael N, Kuppalli K, Franco-Paredes C. Spectrum of CNS disease caused by rapidly growing mycobacteria. *The Lancet infectious diseases*. 2008;8(6):390-8.
108. Levy ZD, Du V, Chiluwal A, Chalif DJ, Ledoux DE. Ventriculoperitoneal shunt infection with Mycobacterium abscessus: a rare cause of ventriculitis. *World neurosurgery*. 2016;86:510. e1-. e4.
109. Montero JA, Alrabaa SF, Wills TS. Mycobacterium abscessus ventriculoperitoneal shunt infection and review of the literature. *Infection*. 2016;44(2):251-3.

110. Baidya A, Tripathi M, Pandey P, Singh UB. Mycobacterium abscessus as a cause of chronic meningitis: a rare clinical entity. *The American journal of the medical sciences*. 2016;351(4):437-9.
111. Lee M-R, Cheng A, Lee Y-C, Yang C-Y, Lai C-C, Huang Y-T, et al. CNS infections caused by Mycobacterium abscessus complex: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;67(1):222-5.
112. Lamb GS, Starke JR. Mycobacterium abscessus infections in children: a review of current literature. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2018;7(3):e131-e44.
113. Moorthy RS, Valluri S, Rao NA. Nontuberculous mycobacterial ocular and adnexal infections. *Survey of ophthalmology*. 2012;57(3):202-35.
114. Nau R, Sörgel F, Eiffert H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(4):858-83.
115. Bajinath S, Naiker S, Shobo A, Moodley C, Adamson J, Ngcobo B, et al. Evidence for the presence of clofazimine and its distribution in the healthy mouse brain. *Journal of molecular histology*. 2015;46(4-5):439-42.
116. Brown-Elliott BA, Mann LB, Hail D, Whitney C, Wallace Jr RJ. Antimicrobial susceptibility of nontuberculous mycobacteria from eye infections. *Cornea*. 2012;31(8):900-6.
117. Kheir WJ, Sheheitli H, Abdul Fattah M, Hamam RN. Nontuberculous mycobacterial ocular infections: a systematic review of the literature. *BioMed research international*. 2015;2015.
118. Rolfe NE, Garcia C, Widen RH, Taylor SP. Rapid diagnosis of Mycobacterium abscessus endophthalmitis. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(7):1089-91.
119. Chu H-S, Chang S-C, Shen EP, Hu F-R. Nontuberculous mycobacterial ocular infections—comparing the clinical and microbiological characteristics between Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense. *PloS one*. 2015;10(1):e0116236.
120. Girgis DO, Karp CL, Miller D. Ocular infections caused by non-tuberculous mycobacteria: update on epidemiology and management. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2012;40(5):467-75.
121. Lee M-R, Ko J-C, Liang S-K, Lee S-W, Yen DH-T, Hsueh P-R. Bacteraemia caused by Mycobacterium abscessus subsp. abscessus and M. abscessus subsp. bolletii: clinical features and susceptibilities of the isolates. *International journal of antimicrobial agents*. 2014;43(5):438-41.
122. El Helou G, Viola GM, Hachem R, Han XY, Raad II. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013;13(2):166-74.
123. Won EJ, Choi YJ, Kim SH, Shin JH. Rapid Diagnosis of Mycobacterium abscessus Bacteremia Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Annals of Clinical Microbiology*. 2016;19(3):77-81.
124. El Helou G, Hachem R, Viola GM, El Zakhem A, Chaftari A-M, Jiang Y, et al. Management of rapidly growing mycobacterial bacteremia in cancer patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;56(6):843-6.
125. Fukui S, Sekiya N, Takizawa Y, Morioka H, Kato H, Aono A, et al. Disseminated Mycobacterium abscessus infection following septic arthritis: a case report and review of the literature. *Medicine*. 2015;94(21).
126. Tejura N, Bontempo G, Chew D, editors. Disseminated Mycobacterium abscessus infection secondary to an infected vascular stent: Case Report and Review of the Literature. *Open forum infectious diseases*; 2018: Oxford University Press US.
127. Benwill JL, Wallace Jr RJ. Mycobacterium abscessus: challenges in diagnosis and treatment. *Current opinion in infectious diseases*. 2014;27(6):506-10.

128. Yang B, Jhun BW, Moon SM, Lee H, Park HY, Jeon K, et al. Clofazimine-Containing Regimen for the Treatment of Mycobacterium abscessus Lung Disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6).
129. Aziz DB, Low JL, Wu M-L, Gengenbacher M, Teo JWP, Dartois V, et al. Rifabutin Is Active against *Mycobacterium abscessus* Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2017;61(6):e00155-17.
130. Adékambi T, Drancourt M. *Mycobacterium bolletii* respiratory infections. *Emerging infectious diseases.* 2009;15(2):302.
131. Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. A novel gene, erm (41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2009;53(4):1367-76.
132. Koh W-J, Jeon K, Lee NY, Kim B-J, Kook Y-H, Lee S-H, et al. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2011;183(3):405-10.
133. Cho EH, Huh HJ, Song DJ, Lee SH, Kim CK, Shin SY, et al. Drug susceptibility patterns of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* isolated from respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;93(2):107-11.
134. Ferro BE, Srivastava S, Deshpande D, Pasipanodya JG, van Soolingen D, Mouton JW, et al. Tigecycline Is Highly Efficacious against *Mycobacterium abscessus* Pulmonary Disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):2895-900.
135. Vesenbeckh S, Schönfeld N, Roth A, Bettermann G, Krieger D, Bauer Torsten T, et al. Bedaquiline as a potential agent in the treatment of *Mycobacterium abscessus* infections. *European Respiratory Journal.* 2017;49(5):1700083.
136. Bax HI, de Vogel CP, Mouton JW, de Steenwinkel JEM. Omadacycline as a promising new agent for the treatment of infections with *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2019;74(10):2930-3.
137. Abdalla MY, Switzer BL, Goss CH, Aitken ML, Singh PK, Britigan BE. Gallium compounds exhibit potential as new therapeutic agents against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2015;59(8):4826-34.
138. Kaushik A, Makkar N, Pandey P, Parrish N, Singh U, Lamichhane G. Carbapenems and rifampin exhibit synergy against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2015;59(10):6561-7.
139. Jarlier V, Nikaido H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *Journal of bacteriology.* 1990;172(3):1418-23.
140. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS microbiology letters.* 1994;123(1-2):11-8.
141. Trias J, Jarlier V, Benz R. Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science.* 1992;258(5087):1479-81.
142. Sander P, Luthra S, Rominski A. The role of antibiotic-target-modifying and antibiotic-modifying enzymes in *Mycobacterium abscessus* drug resistance. *Frontiers in microbiology.* 2018;9:2179.
143. Aínsa JA, Pérez E, Pelicic V, Berthet FX, Gicquel B, Martín C. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the aac (2')-Ic gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the aac (2')-Id gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular microbiology.* 1997;24(2):431-41.
144. Nurizzo D, Shewry SC, Perlin MH, Brown SA, Dholakia JN, Fuchs RL, et al. The crystal structure of aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa, an enzyme responsible for antibiotic resistance. *Journal of molecular biology.* 2003;327(2):491-506.

145. Rossi ED, Aínsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS microbiology reviews*. 2006;30(1):36-52.
146. Louw G, Warren R, van Pittius NG, McEvoy C, Van Helden P, Victor T. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(8):3181-9.
147. Ramis IB, Vianna JS, Junior LS, von Groll A, Ramos DF, Zanatta N, et al. In silico and in vitro evaluation of tetrahydropyridine compounds as efflux inhibitors in *Mycobacterium abscessus*. *Tuberculosis*. 2019;118:101853.
148. Gutiérrez AV, Richard M, Roquet-Banères F, Viljoen A, Kremer L. The TetR Family Transcription Factor MAB\_2299c Regulates the Expression of Two Distinct MmpS-MmpL Efflux Pumps Involved in Cross-Resistance to Clofazimine and Bedaquiline in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019;63(10):e01000-19.
149. da Silva PEA, Machado D, Ramos D, Couto I, Von Groll A, Viveiros M. Efflux pumps in mycobacteria: antimicrobial resistance, physiological functions, and role in pathogenicity. *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria*: Springer; 2016. p. 527-59.
150. Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997;41(10):2270-3.
151. Matrat S, Aubry A, Mayer C, Jarlier V, Cambau E. Mutagenesis in the  $\alpha 3\alpha 4$  GyrA helix and in the toprim domain of GyrB refines the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase to intrinsic resistance to quinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(8):2909-14.
152. Prammananan T, Sander P, Brown BA, Frischkorn K, Onyi GO, Zhang Y, et al. A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *Journal of Infectious Diseases*. 1998;177(6):1573-81.
153. Nessar R, Reytrat JM, Murray A, Gicquel B. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(8):1719-24.
154. Wallace R, Meier A, Brown BA, Zhang Y, Sander P, Onyi GO, et al. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996;40(7):1676-81.
155. Bastian S, Veziris N, Roux A-L, Brossier F, Gaillard J-L, Jarlier V, et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by erm (41) and rrl sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(2):775-81.
156. Monego F, Duarte RS, Biondo AW. gyrA and gyrB gene mutation in ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium massiliense* clinical isolates from Southern Brazil. *Microbial drug resistance*. 2012;18(1):1-6.
157. Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G, et al. CLSI Standards: Guidelines for Health Care Excellence. M62: Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp, and Other Aerobic Actinomycetes. 1st ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
158. Shen Y, Wang X, Jin J, Wu J, Zhang X, Chen J, et al. In Vitro Susceptibility of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium fortuitum* Isolates to 30 Antibiotics. *BioMed research international*. 2018;2018.
159. Aono A, Morimoto K, Chikamatsu K, Yamada H, Igarashi Y, Murase Y, 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):117-23.
160. Lee SY, Kim HY, Kim BJ, Kim H, Seok SH, Kim BJ, et al. Effect of amikacin on cell wall glycopeptidolipid synthesis in *Mycobacterium abscessus*. *J Microbiol*. 2017;55(8):640-7.



161. Kim HY, Kim BJ, Kook Y, Yun YJ, Shin JH, Kim BJ, et al. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. *Microbiology and immunology*. 2010;54(6):347-53.
162. Novosad SA, Beekmann SE, Polgreen PM, Mackey K, Winthrop KL. Treatment of *Mycobacterium abscessus* infection. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(3):511.
163. Wu M, Li B, Guo Q, Xu L, Zou Y, Zhang Y, et al. Detection and Molecular Characterization of Amikacin-resistant *Mycobacterium abscessus* Isolated from Patients with Pulmonary Disease. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2019.
164. Dudek M, Romanowska J, Wituła T, Trylska J. Interactions of amikacin with the RNA model of the ribosomal A-site: computational, spectroscopic and calorimetric studies. *Biochimie*. 2014;102:188-202.
165. Lee H, Sohn Y, Ko J, Lee S, Jhun B, Park H, et al. Once-daily dosing of amikacin for treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2017;21(7):818-24.
166. Chua KY, Bustamante A, Jelfs P, Chen SC, Sintchenko V. Antibiotic susceptibility of diverse *Mycobacterium abscessus* complex strains in New South Wales, Australia. *Pathology*. 2015;47(7):678-82.
167. Kobayashi T, Tsuyuguchi K, Yoshida S, Kurahara Y, Ikegami N, Naito M, et al. *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* lung disease: Drug susceptibility testing in sputum culture negative conversion. *International journal of mycobacteriology*. 2018;7(1):69.
168. Hatakeyama S, Ohama Y, Okazaki M, Nukui Y, Moriya K. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan. *BMC infectious diseases*. 2017;17(1):197.
169. Sriram R, Sarangan P. 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):6.
170. Pang H, Li G, Zhao X, Liu H, Wan K, Yu P. Drug susceptibility testing of 31 antimicrobial agents on rapidly growing mycobacteria isolates from China. *BioMed research international*. 2015;2015.
171. Reyhanoglu G, Reddivari AKR. *Tobramycin*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing  
StatPearls Publishing LLC.; 2019.
172. Aono A, Morimoto K, Chikamatsu K, Yamada H, Igarashi Y, Murase Y, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacteroides* (*Mycobacterium*) *abscessus* complex, *Mycobacterium* (*Mycobacterium*) *fortuitum*, and *Mycobacteroides* (*Mycobacterium*) *chelonae*. *J Infect Chemother*. 2019;25(2):117-23.
173. Lavollay M, Dubee V, Heym B, Herrmann JL, Gaillard JL, Gutmann L, et al. In vitro activity of ceftazidime and imipenem against *Mycobacterium abscessus* complex. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(5):O297-300.
174. Barrow WW. Treatment of mycobacterial infections. *Rev Sci Tech*. 2001;20(1):55-70.
175. Nasiri MJ, Haeili M, Ghazi M, Goudarzi H, Pormohammad A, Imani Fooladi AA, et al. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacteria*. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8(681).
176. Monego F, Duarte RS, Biondo AW. *gyrA* and *gyrB* gene mutation in ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium massiliense* clinical isolates from Southern Brazil. *Microb Drug Resist*. 2012;18(1):1-6.

177. de Moura VC, da Silva MG, Gomes KM, Coelho FS, Sampaio JL, Mello FC, et al. Phenotypic and molecular characterization of quinolone resistance in *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* recovered from postsurgical infections. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 1):115-25.
178. Kim SY, Jhun BW, Moon SM, Shin SH, Jeon K, Kwon OJ, et al. Mutations in *gyrA* and *gyrB* in Moxifloxacin-Resistant *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium abscessus* Complex Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(9).
179. Choi G-E, Min K-N, Won C-J, Jeon K, Shin SJ, Koh W-J. Activities of moxifloxacin in combination with macrolides against clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(7):3549-55.
180. Kim SY, Kim C-K, Bae IK, Jeong SH, Yim J-J, Jung JY, et al. The drug susceptibility profile and inducible resistance to macrolides of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* in Korea. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2015;81(2):107-11.
181. Enany S. *Basic Biology and Applications of Actinobacteria: BoD–Books on Demand*; 2018.
182. de Moura VCN, da Silva MG, Gomes KM, Coelho FS, Sampaio JLM, de Queiroz Mello FC, et al. Phenotypic and molecular characterization of quinolone resistance in *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* recovered from postsurgical infections. *Journal of medical microbiology*. 2012;61(1):115-25.
183. Pfister P, Jenni S, Poehlsgaard J, Thomas A, Douthwaite S, Ban N, et al. The structural basis of macrolide–ribosome binding assessed using mutagenesis of 23 S rRNA positions 2058 and 2059. *Journal of molecular biology*. 2004;342(5):1569-81.
184. Lee SH, Yoo HK, Kim SH, Koh W-J, Kim CK, Park YK, et al. The drug resistance profile of *Mycobacterium abscessus* group strains from Korea. *Annals of laboratory medicine*. 2014;34(1):31-7.
185. Lee SH, Yoo HK, Kim SH, Koh WJ, Kim CK, Park YK, et al. Detection and assessment of clarithromycin inducible resistant strains among Korean *Mycobacterium abscessus* clinical strains: PCR methods. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2014;28(5):409-14.
186. Shallom SJ, Moura NS, Olivier KN, Sampaio EP, Holland SM, Zelazny AM. New real-time PCR assays for detection of inducible and acquired clarithromycin resistance in the *Mycobacterium abscessus* group. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(11):3430-7.
187. Rubio M, March F, Garrigó M, Moreno C, Español M, Coll P. Inducible and acquired clarithromycin resistance in the *Mycobacterium abscessus* complex. *PloS one*. 2015;10(10):e0140166.
188. Mougari F, Bouziane F, Crockett F, Nessar R, Chau F, Veziris N, et al. Selection of resistance to clarithromycin in *Mycobacterium abscessus* subspecies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(1):e00943-16.
189. Mase A, Yamaguchi F, Funaki T, Yamazaki Y, Shikama Y, Fukuchi K. PCR amplification of the *erm* (41) gene can be used to predict the sensitivity of *Mycobacterium abscessus* complex strains to clarithromycin. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020;19(2):945-55.
190. Lipworth S, Hough N, Leach L, Morgan M, Jeffery K, Andersson M, et al. Whole-Genome Sequencing for Predicting Clarithromycin Resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;63(1):e01204-18.
191. Cavusoglu C, Gurpinar T, Ecemis T. Evaluation of antimicrobial susceptibilities of rapidly growing mycobacteria by Sensititre RAPMYCO panel. *New Microbiologica*. 2012;35(1):73-6.