

NON-TÜBERKÜLOZ MİKOBAKTERİ İNFEKSİYONLARINDA LABORATUVAR TANI ve DUYARLILIK TESTLERİ

Y. Doç. Dr. Alpaslan Alp

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Non-Tüberküloz Mikobakteri İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanısı

Tüberküloz tanısında ilk basamak, aside dirençli boyama yöntemlerinin uygulanmasıdır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basil görülmesinden sonra, klinik ve radyolojik bulgular da tüberküloz tanısını desteklemekteyse, genellikle tüberküloz tedavisine hemen başlanmaktadır. Daha sonraki süreçte elde edilen kültür ve duyarlılık test sonuçları, verilen tedavinin daha etkin kılınmasını sağlamaktadır. Ancak *Mycobacterium tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin (NTM: Non-tuberculous mycobacteria; NTM: Mycobacteria other than *M. tuberculosis*; atipik mikobakteriler) mikroskopik inceleme ile ayırtililmesi mümkün olmadığından, NTM ile infekte hastalarda tedavi etkisiz kalabilmektedir. NTM türlerinin büyük çoğunluğu klasik antitüberküloz ilaçlara karşı dirençlidir. Bu durumda hem hastaya yararı olmayan bir ilacın gereksiz yere kullanılması, hem de hastanede kalış süresinin uzaması önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle tedaviye başlanmadan

önce mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

NTM infeksiyonlarının laboratuvar tanısı, kültür yöntemleri ile mikobakteri izolasyonu sonrasında, ek yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir. Hasta örneğinden kültür yöntemleriyle mikobakteri izolasyonu sonrasında takip edilen yol öncelikle, *M. tuberculosis* kompleksi ile NTM türlerinin ayırımının yapılmasıdır. Bu aşama NTM tanısı ile sonuçlanırsa bundan sonraki basamak, elde edilmiş olan NTM türünün idantifikasyonudur. Bu nedenle NTM infeksiyonlarının laboratuvar tanısı genel olarak, mikobakterilerin tür düzeyinde idantifikasyonuna dayanmaktadır. NTM'lerin tür düzeyinde idantifikasyonu, bu suşlarla infekte hastalara gereksiz tedavinin verilmesini önlemekte, doğru tedavi yaklaşımları sayesinde ekonomik kayıplara engel olunabilmektedir. Mikobakterilerin tür düzeyinde idantifikasyonu epidemiyolojik açıdan da büyük önem taşımaktadır. Bu sayede son yıllara kadar sadece "atipik mikobakteriyel infeksiyon" olarak tanımlanan

enfeksiyonların gerçek enfeksiyöz etkenleri tür düzeyinde isimlendirilebilmektedir.

Mikroorganizmaların identifikasyonu yapılırken hem fenotipik, hem de genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır. Mikobakterilerin identifikasyonunda kaydedilen gelişmelere bakıldığında, 1980'li yıllara kadar fenotipik özelliklerin incelendiği testlerin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. 1980'lerden günümüze kadar olan süreçte ise moleküler yöntemlerdeki ilerlemenin etkisiyle genotipik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır.

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

fazla farklılık gösteren tür, 7 farklı nükleotid içeren *M. avium* kompleksidir.

AIDS olgularının artmasıyla birlikte, *M. tuberculosis* dışındaki mikobakterilerle oluşturulan enfeksiyonlarda da belirgin artışlar görülmeye başlanmıştır. Normal şartlarda insan için patojen olmayan bazı mikobakteri türleri, immün sistemin zayıfladığı AIDS gibi durumlarda, hayatı tehdit edecek önemli enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Tüberküloz olgu sayısında görülen son yıllardaki artışın en önemli nedeni, başta *M. avium-intracellulare* olmak üzere, NTM türleri ile oluşturulan enfeksiyonların çoğalmasındır.

NTM türlerinin birçoğu toprakta, suda, toz taneciklerinde, evcil veya vahşi hayvanlarda, sütte ve diğer besin maddelerinde bulunurlar. İnsanlara çevreden bulaşabilirler veya vücut yüzeyi ve sekresyonlarında kolonize olabilirler. Doğada yaygın olarak bulunmalarına karşın, insan için potansiyel patojen olabilen NTM türleri, belirli coğrafi bölgelerde daha sık görülme eğilimindedirler. Değişik çalışmalardan elde edilmiş verilere göre, NTM türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonlar, tüm mikobakteriyel enfeksiyonların %1-35'ini oluşturmaktadır. Bu aralığın bu kadar geniş olması, bugüne kadar NTM enfeksiyonlarına çoğu zaman tanı konamamasına bağlanmaktadır.

NTM Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Biyokimyasal Testler

NTM enfeksiyonlarında, özgül klinik bulgular yoktur. Kesin tanının mikrobiyolojik inceleme sonucunda konması gereklidir. NTM türlerinin tanımlanması amacıyla kullanılan

çeşitli klasik biyokimyasal yöntemler mevcuttur. Bu biyokimyasal yöntemlerde genel olarak, kültür yöntemleriyle bakteri üretildikten sonra, NTM türlerinin fenotipik özellikleri araştırılmaktadır. Ancak fenotipik özellikler sadece sınırlı sayıda türün birbirinden ayırtedilebilmesini sağlayabilmektedir. Bunlardan katalaz testi, *M. tuberculosis*, *M. gastri* ve *M. kansasii*'yi diğer mikobakterilerden ayırtedebilmek amacıyla kullanılır. Tüm mikobakteriler katalaz deneyi ile olumlu sonuç verirken, bu üç mikobakteri türü olumsuz sonuç verirler.

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

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

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

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

Görüldüğü gibi biyokimyasal testler, ancak belli mikobakteri türlerinin birbirlerinden

ayırtedilmesini sağlayabilmektedir. Ayrıca kesin tanımlama yapılabilmesi için bu testlerin hepsinin uygulanması gerektiğinden ve bunun için uzun bir süre gerektiğinden, günümüzde biyokimyasal testler rutin kullanımda çok fazla kabul görmemektedirler.

NTM İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Kültür Yöntemleri

NTM infeksiyonlarının laboratuvar tanısında en yaygın olarak kullanılan kültür yöntemi, BACTEC 460 TB sistemidir (Becton Dickinson). BACTEC 460 TB sisteminde NAP (p-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropionophenone) testi ile, *M. tuberculosis* kompleksi ve NTM ayrımı yapılabilmektedir. Ülkemizde NTM infeksiyonlarının tanısında halen en yaygın olarak kullanılmakta olan yöntem NAP testidir. Ancak testin sonuçlanması bir haftayı bulmakta ve NTM türlerinin tür düzeyinde isimlendirilebilmesi mümkün olmamaktadır.

NTM İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler

Günümüzde klinik örneklerde saptanan mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla biyokimyasal testler yerine moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Mikobakterilerin moleküler yöntemlerle identifikasyonunda, hedef olarak seçilmiş olan en önemli gen bölgeleri, 16S rRNA, *hsp65*, *recA* ve *rpoB* genleridir. 16S rRNA geni, bakterilerin moleküler identifikasyonunda altın standart olarak kabul edilen bir hedef bölgedir. Çünkü hem her bakteriye özgü çok iyi saklanmış diziler

içerir, hem de her türe göre değişen dizilere sahiptir. Bu değişken dizilerin PCR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir. 16S rRNA geninin dizi analizi tüm mikobakteri türlerinin tanımlanmasını sağlayabilmektedir. Ancak dizi analizi yöntemlerinde, elde edilen bakteri dizilerinin bilgisayar ortamında karşılaştırılması gereken standart dizilere ihtiyaç vardır. Değişik kaynaklardan elde edilmiş standart dizilerde de zaman zaman farklılıklar ortaya çıkabilmekte ve yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Bir standardizasyon sağlamak ve dizi analizi sonuçlarının güvenilirliğini arttırmak amacıyla kurulmuş standart dizi analizi servisleri mevcuttur. Bu servislerden biri olan RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), web tabanlı üzerinde dizi analizi yanısıra fenotipik ve genotipik özellikleri de sunmaktadır. Ayrıca dizi analizi amacıyla üretilmiş olan ticari kitler de mevcuttur. Bunlardan MicroSeq 500 16S rDNA bakteriyel dizi analizi kiti (Applied Biosystems), mikobakteriyel 16S rRNA 5' ucundan 500 baz çiftlik bir bölgenin amplifikasyonunu ve sonrasında dizi analizini sağlayarak tür düzeyinde identifikasyon gerçekleştirmektedir.

16S rRNA dizilerinin karşılaştırılması mikobakterilerin identifikasyonunda güvenilir bir yöntem olmakla birlikte, *M. gastri* ve *M. kansasii* gibi bazı türlerin ayırtedilmesinde yetersiz kalabilmektedir. Bu gibi türlerin identifikasyonu amacıyla, *recA* gen dizilerinin karşılaştırılmasından da yararlanılmaktadır. *recA* geni tüm bakterilerde bulunan, DNA hasar onarımı, DNA sentezi ve hücre bölünmesinde rolü olan bir gendir. Bu gen bölgesinin kullanılmasıyla, özellikle 16S rRNA gen dizileri

çok benzer çıkan türlerin ayırtedilebildiği gösterilmiştir.

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

PCR-restriksiyon enzim analizi yöntemi, mikobakterilerin identifikasyonunda kullanılan pratik ve ekonomik bir yöntemdir. Restriksiyon enzim analizi için çeşitli çalışmalarda 16S rRNA, *hsp65* "heat shock protein" geni ve *rpoB* geni hedef olarak seçilmiştir. Yapılan çalışmalarda, RNA polimeraz enzimini kodlayan *rpoB* geninin dört restriksiyon enzimi ile (*HaeIII*, *HindIII*, *MvaI* ve

AccII) kesilmesi ile elde edilen bant paternleri, standart bant paternleri ile karşılaştırılarak mikobakteri türlerinin identifikasyonu sağlanmıştır. PCR-restriksiyon enzim analizi yönteminde son yıllarda seçilmiş hedef bölgelerden biri de ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesidir. Bu bölge, 16S ve 23S rRNA'ları kodlayan genler arasında bulunan bir diziden oluşmaktadır. Bu dizide de, her türe özgü farklı nükleotidler bulunması nedeniyle, yapılan çalışmalarda mikobakterilerin identifikasyonu sağlanabilmektedir. Ancak bu bölgedeki polimorfizm oranının çok yüksek olması nedeniyle, sonuçların değerlendirilmesinde bazı zorluklar yaşandığı görülmüştür.

65 kDa ağırlığındaki hsp65 genini hedef alarak yapılan PCR-restriksiyon enzim analizi, yaygın olarak kullanılmakta olan mikobakteri identifikasyon yöntemlerinden biridir. hsp65 geni, hem çok iyi korunmuş diziler içermekte, hem de türden türe farklılık gösteren diziler bulundurmaktadır. Bu genin 441 baz çiftlik bir dizisi PCR-restriksiyon enzim analizinde çoğaltılarak kullanılmaktadır. İki özgül primer kullanılarak çoğaltılan ürünler, *Bst*II ve *Hae*III restriksiyon enzimleri ile kesilmektedir. Böylece elde edilen restriksiyon parçaları poliakrilamid jelde yürütülerek ayrıştırılmaktadır. Poliakrilamid jel elektroforezi sonrasında görülen bantın molekül ağırlığının tam olarak anlaşılabilmesi için molekül ağırlık standartı ile karşılaştırılması gereklidir. İki restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda, 80'e yakın mikobakteri türünün herbiri kendine özgü bantlar oluşturduğundan, oluşan bantların molekül ağırlığının belirlenmesi mikobakterilerin identifikasyonunu sağlamaktadır. Bunun için tek yapılması gereken, örneklerde oluşmuş

bantların molekül ağırlık standartı ile karşılaştırılarak ağırlıklarının saptanması ve hangi türün bantları ile uyduğuna bakılmasıdır. Böylece her örnekte iki restriksiyon enzimi ile oluşturulan parçalardaki bantlar saptanarak NTM türünün ismi belirlenebilmektedir.

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

Son yıllarda NTM infeksiyonlarının tanısında mikolik asit analizi de kullanılmaya başlanmıştır. Mikolik asitler mikobakteri hücre duvarının önemli bir kısmını oluşturan uzun zincirli β -hidroksi yağ asitleridir. Her mikobakteri türünde farklı fonksiyonel gruplar ve farklı karbon sayılı mikolik asitler bulunur. Mikolik asitlerdeki karbon atomu sayısı genellikle 60 ile 90 arasında değişir. Bu türe özgü farklılıklar nedeniyle mikolik asit analizi gerçekleştirilerek mikobakterilerin identifikasyonu yapılabilmektedir. Bu amaçla kullanılan yöntemler "thin-layer chromatography" (TLC), high-performance liquid chromatography" (HPLC) ve "gas-liquid chromatography" (GLC)

yöntemleridir. TLC yöntemi uygulanarak, mikolik asitler taşıdıkları ester gruplarına göre 7 grup altında toplanmaktadırlar. Bundan sonraki aşamada, mikobakteri hücresinden metil esterifikasyonu ile saflaştırılan mikolik asitler silikon jel üzerinde yürütülmekte ve oluşan paternler standart suşlarla karşılaştırılarak identifikasyon sağlanabilmektedir.

HPLC analizinde, mikolik asitler polarite ve karbon sayılarına göre ayırtedilebilmektedir. Daha polar olan ve kısa karbon zincirli mikolik asitler, daha kısa elüsyon zamanlarına sahip olmaktadır. Bu aşamadan sonra elde edilen grafikler (kromatogram), standart suşların grafikleriyle karşılaştırılarak identifikasyon sağlanmaktadır.

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

Sonuç olarak, NTM infeksiyonlarının laboratuvar tanısında biyokimyasal testler, pratik olmamaları, uzun zaman gerektirmeleri ve tüm türlerin tanımlanmasını sağlayamadıklarından, rutin kullanım için uygun değildirler. Moleküler yöntemler, mikobakteri türleri arasında farklılık gösteren gen bölgelerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Hedef olarak seçilen başlıca gen bölgeleri 16S rRNA, *hsp65*, *recA* ve *rpoB* genleridir. Bu gen bölgelerinin dizi analizi sonucunda saptanarak, standart suşlarla karşılaştırılması ile güvenilir bir şekilde tür tayini yapılabilmektedir. Ancak dizi analizi sadece

büyük referans laboratuvarlarında yapılabilen pahalı bir yöntemdir. SSCP ve HPLC yöntemleri, dizi analizine alternatif olarak kullanılabilecek hızlı ve özgül yöntemlerdir. PCR-restriksiyon enzim analizi yöntemi de, yaygın olarak kullanılmaya başlanmış olan bir diğer alternatif yöntemdir. Restriksiyon enzim analizi için çeşitli çalışmalarda 16S rRNA, *hsp65* geni ve *rpoB* geni hedef olarak seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar, PCR-restriksiyon enzim analizi yönteminin rutin laboratuvar kullanımına uygun, ekonomik, pratik ve hızlı bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Non-Tüberküloz Mikobakteri İnfeksiyonlarında Duyarlılık Testleri

Günümüzde NTM infeksiyonlarının laboratuvar tanısında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. NTM infeksiyonu tanısı konduktan sonra, uygun tedaviye karar verilebilmesi için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gerekmektedir. NTM türlerinin duyarlılık testlerinde de, *M. tuberculosis* kompleksi için kullanılan yöntemler uygulanmaktadır. Ancak test edilen antimikobakteriyel ajanlar birinci sıra ilaçlarla sınırlı tutulmamakta, bunlara ek olarak NTM infeksiyonlarında kullanılabilen çeşitli ilaçlar da eklenmektedir. Günümüzde halen bütün NTM türlerinin duyarlılık testlerine yönelik bir standardizasyon sağlanamamış, bu yönde yapılmış olan çalışmalar belli türlerle sınırlı kalmıştır. "National Committy for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) tarafından 2000 yılında M24-T2 kodu ile tüberküloz dışı mikobakterilerlerin duyarlılık testlerini de

içeren standartlar belirlenmiştir. M24-T2 rehberine göre, mikobakterilerin duyarlılık test protokolleri *M. tuberculosis* kompleksi, yavaş üreyen non-tüberküloz mikobakteriler ve hızlı üreyen mikobakteriler olmak üzere üç ana grupta toplanmıştır. NCCLS tarafından, "American Thoracic Society" 'nin NTM infeksiyonlarının tedavisinde önerdiği ilaçlar doğrultusunda, standart duyarlılık test protokolleri oluşturulmuştur.

NCCLS, agar proportion metodunu pirazinamid dışındaki antitüberküloz ilaçlarda standart metod olarak kabul etmektedir. Standart metod olarak kabul edilen agar proportion metodu yaklaşık üç haftada sonuçlanmaktadır. Daha çabuk duyarlılık test sonucuna ulaşabilmek için "Food and Drug Administration" (FDA), sıvı besiyerinin kullanıldığı radyometrik BACTEC 460 TB sistemini önermiş olup, bu sistem bugün yaygın olarak kullanılmaktadır. Pirazinamid duyarlılık testi için ise, düşük pH değerinde radyometrik BACTEC 460 TB şişeleri üretilmiştir.

Yavaş üreyen NTM türleri insanlarda hastalık oluşturabildiği gibi kolonizasyon nedeni ile de kültürde üreyebilirler. Bu nedenle bu tür mikroorganizmaların kesin olarak hastalık etkeni olduğunun saptanması durumunda duyarlılık testi yapılmalıdır. Yavaş üreyen NTM'lerden *M. avium* kompleksi (MAC), *M. kansasii* ve *M. marinum* için standart protokol geliştirilmiştir. MAC tedavisinde 1-2 aylık monoterapi uygulaması sonrasında makrolidlere çok kısa sürede direnç geliştiği gözlenmiştir. Makrolidlere direnç gösteren MAC izolatlarının %95'inden fazlasında 23S RNA geninin V bölgesinde nokta

mutasyonu saptanmıştır. Üç ay verilen tedaviye rağmen kültür pozitifliği devam eder (KOAH'lılarda 6 ay), bu sürede klinik düzelme olmaz veya hastalık dissemine şekle dönerse duyarlılık testi yapılmalı, daha önce yapılmış ise tekrarlanmalıdır. MAC'ın duyarlılık sonuçlarının klinikle korelasyon çalışmaları sadece makrolid grubunda yapılmıştır. Bu nedenle MAC duyarlılık testinde azitromisin ve klaritromisin duyarlılığı araştırılabilir. Azitromisinin düşük çözünürlüğü nedeniyle, klaritromisin duyarlılık testi tercih edilmektedir.

MAC duyarlılık testi, sıvı besiyerleri kullanılarak yapılmaktadır. Makrodilüsyon için radyometrik BACTEC sistemi, mikrodilüsyon için ise mikrokuyucuklar önerilmektedir. Makrolidlerin hafif alkali pH'da (7.3-7.4), asidik pH'ya (6.8) göre daha aktif oldukları bilinmektedir. Bu nedenle NCCLS makrolidler için farklı pH'da iki ilaç kritik konsantrasyonu önermektedir.

M. kansasii infeksiyonlarında rutin olarak kullanılan antitüberküloz ajanlar rifampisin, etambutol ve isoniaziddir. Ancak, bazen tedavi yetersizliği gözlenebilir ve bundan genellikle rifampisin sorumludur. Bu nedenle başlangıç tedavisine yetersiz cevap veren olgulara antibiyotik duyarlılık testi yapılmalıdır. NCCLS tedavi almamış hastalardan izole edilen tüm *M. kansasii* suşlarına rifampisin direnç testinin yapılmasını önermektedir. Rifampisine duyarlı suşlar aynı zamanda rifabutine de duyarlı olduğu için, rifabutin duyarlılık testine gerek yoktur. Ancak rifampisin dirençli olgularda rifabutin, ethambutol,

streptomisin, isoniazid, klaritromisin, amikasin, siprofloksasin ve trimetoprim sülfametoksazol (TMP-SMZ) veya sülfometoksazol duyarlılık testleri yapılmalıdır.

M.marinum'un duyarlılık testinin yapılması iki nedenden dolayı önerilmemektedir. Birincisi, *M.marinum* antimikrobiyal ajan olarak kullanılan rifampisin, ethambutol, doksisisiklin, minosiklin, TMP-SMZ ve klaritromisine her zaman duyarlı bulunmaktadır. İkincisi, mutasyona bağımlı direnç gelişim riski son derece küçüktür. Bununla birlikte *M.marinum*'un duyarlılık testi birkaç aylık tedaviye rağmen klinik olarak cevap alınamayan veya kültür pozitifliği devam eden olgularda önerilmektedir. *M.marinum* duyarlılık testinde rifampisin, ethambutol, klaritromisin, amikasin ve sulfametoksazol veya TMP-SMZ test edilir.

NCCLS, hızlı üreyen mikobakterilerden *M.fortuitum* grubu mikobakteriler (*M.fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum* II: varyant kompleksi), *M.chelonea* ve *M.abcessus* için standart mikrodilüsyon yöntemini önermektedir. Aynı zamanda *M.mucogenicum*, *M.smegmatis* grubu (*M.smegmatis*, *M.goodi*, *M.wolinskyi*) için de mikrodilüsyon yönteminin uygulanabileceği bildirilmiştir. Bu tür bakteriler için duyarlılık testinin ancak steril boşluklardan izolasyon söz konusu olduğunda yapılması önerilmektedir. Hızlı üreyen mikobakteriler hastalık etkeni olabilecekleri gibi, solunum yollarında da geçici olarak kolonize olabilirler. Bu nedenle balgam kültürlerinin birinde birkaç koloninin üremesi büyük bir olasılıkla kolonizasyonu

gösterir ve duyarlılık testine gerek yoktur. Ayrıca 6 aylık tedaviye rağmen kültür pozitifliği devam ediyorsa, duyarlılık testi tekrarlanmalıdır.

Hızlı üreyen mikobakterilerin duyarlılık testinde amikasin, sefoksitin, siprofloksasin, klaritromisin, doksisisiklin, imipenem, sülfametoksazol veya TMP-SMZ kullanılır. *M.chelonea* ve *M. abcessus* suşları TMP-SMZ'e dirençli olmakla birlikte, *M.fortuitum* duyarlıdır. Ayrıca *M.chelonea* için tobramisin de test edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Blackwood KS, He C, Gunton J, Turenne CY, Wolfe J, Kabani AM. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol 2000 ; 38:2846-2852.
2. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. J Clin Microbiol 2001; 39:2799-2806.
3. Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY, Jama M, Hillyard DR, Carroll KC. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. J Clin Microbiol 2002 ; 40:400-406.
4. Ghoszi R, Morand P, Ferroni A, Beretti JL, Bingen E, Segonds C, Husson MO, Izard D, Berche P, Gaillard JL. Capillary electrophoresis-single-strand conformation polymorphism analysis for rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from

- patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1999; 37:3374-3379.
5. Gillman LM, Gunton J, Turenne CY, Wolfe J, Kabani AM. Identification of *Mycobacterium* species by multiple-fluorescence PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 2001; 39:3085-3091.
6. Kim BJ, Lee KH, Park BN, Kim SJ, Bai GH, Kim SJ, Kook YH. Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol 2001; 39:2102-2109.
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1997: 893.
8. Nolte FS, Metchock B. Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington DC. 1995: 400.
9. Park H, Jang H, Kim C, Chung B, Chang CL, Park SK, Song S. Detection and identification of mycobacteria by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus and species-specific PCR primers. J Clin Microbiol 2000; 38: 4080-4085.
10. Saniç A. Mikobakterilerde antibiyotik duyarlılık testleri. XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı 2002: 141-143
11. Siddiqi SH. BACTEC TB System Product and Procedure Manual, Becton Dickinson, Maryland. 1989.
12. Somoskovi A, Mester J, Hale YM, Parsons LM, Salfinger M. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. Clin Chest Med 2002; 23: 585-597.
13. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: Molecular versus phenotypic methods. J Clin Microbiol 1996 ; 34:296-303.
14. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993; 31:175-178.
15. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy : the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 319-354.
16. Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases : Identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol 2001 ; 39:3637-3648.
17. Turenne CY, Witwicki E, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani A. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single stranded conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 2000; 38:513-520.