

PİGMENT OLUŞTURAN İKİ YENİ MİKOBAKTERİ İZOLATININ TANIMLANMASI

CHARACTERIZATION OF TWO NEW PIGMENTED MYCOBACTERIA ISOLATES

*Cengiz ÇAVUŞOĞLU**, *Enrico TORTOLI***

ÖZET: Bu çalışmada balgam örneklerinden izole edilen pigment oluşturan iki mikobakteri izolatu çeşitli biyokimyasal özellikleri, yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) ile yapılan tüm hücre duvarı lipid analizleri, *hsp65* ve 16S rRNA geni dizi analizleri temel alınarak tanımlanmıştır. *Mycobacterium sp.* G1368 ve *Mycobacterium sp.* E498'in *hsp65* ve 16S rRNA geni nükleotit dizileri DDBJ/EMBL/GenBank veri tabanlarında AY553874, DQ324791 ve AY379074, DQ324792 kabul numaraları ile saklanmıştır. *Mycobacterium sp.* G1368'in 37°C ve 42°C'de 7 gün içinde düzgün kenarlı, sarı pigmentli koloniler oluşturduğu, üreyi hidrolize ettiği, nitratı indirgediği, 14 günlük aril sülfataz, pirazin amidaz, ısıya dirençli ve semikantitatif katalaz testlerinin pozitif, Tween 80 hidrolizinin ise zayıf pozitif olduğu, buna karşın *Mycobacterium sp.* E498'in 37°C'de 9 gün içinde düzgün kenarlı, sarı pigmentli koloniler oluşturduğu, Tween 80'i hidrolize ettiği, 14 günlük aril sülfataz, ısıya dirençli katalaz testlerinin pozitif, üreaz ve nitrat indirgeme testlerinin ise negatif olduğu saptanmıştır. Bu bulgular ve filogenetik ağaçtaki pozisyonları özellikle *Mycobacterium sp.* G1368'in yeni bir tür olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar sözcükler: 16S rDNA, *hsp65* geni, yüksek performanslı likit kromatografi, DNA dizi analizi, pigment oluşturan mikobakteri.

ABSTRACT: Two pigmented mycobacteria isolated from sputum specimens were described by biochemical tests, whole-cell fatty acid analyses by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and sequencing of 65-kDa heat shock protein gene and 16S rRNA gene. The *hsp65* gene and 16S rRNA gene sequences of the *Mycobacterium sp.* G1368 and *Mycobacterium sp.* E498 were deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under accession numbers AY553874, DQ324791 and AY379074, DQ324792, respectively. *Mycobacterium sp.* G1368 grew in about one week at 37°C and 42°C and produced smooth, yellow colonies. It reduced tellurite and hydrolyzed urea. Nitrate reduction, aryl sulfatase, pyrazin amidase,

*Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

**Careggi Hastanesi, Bölge Mikobakteri Referans Merkezi, Mikrobiyoloji ve Viroloji Laboratuvarı, Floransa, İtalya.

heat stable catalase and semiquantitative catalase tests were also positive, while Tween 80 hydrolysis was weakly positive. *Mycobacterium* sp. E498 grew in about 9 days at 37°C and formed smooth, yellow colonies. It hydrolyzed Tween 80, possessed aryl sulfatase, pyrazin amidase and heat stable catalase, however, it did not possess urease and nitrate reductase. These data, in addition to their position in the phylogenetic tree, strongly support the status of novel species at least for *Mycobacterium* sp. G1368.

Key words: 16S rDNA, hsp65 gene, high-performance liquid chromatography, DNA sequencing, pigmented mycobacteria.

GİRİŞ

Bağışık yetmezlikli olguların sayısındaki artışa ve tanı tekniklerindeki gelişmelere bağlı olarak her geçen gün daha fazla sayı ve türde atipik mikobakteri hastalık etkeni olarak izole edilmektedir. Mikobakteriler geleneksel olarak biyokimyasal testler veya hücre duvarının lipid analiziyle tanımlanmaktadır. Ancak tüm klinik mikobakteri izolatlarının yaklaşık %14'ü fenotipik yöntemlerle tanımlanamamaktadır. Son yıllarda, konvansiyonel tanımlama işlemlerinin yerine DNA dizi analizi gibi moleküler yöntemlerin kullanıma girmesiyle mikobakterilerin taksonomisinde önemli ilerlemeler sağlanmış, çok sayıda yeni mikobakteri türü bulunmuş ve yeni taksonomik gruplar tanımlanmıştır. Ribozomal 16S rRNA geni, 16S ve 23S rRNA genleri arasında yer alan ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi ile *rpoB*, *hsp65*, *recA* ve *sodA* gibi protein kodlayan (housekeeping) genler mikobakterilerin tür tanımlamasında kullanılan hedef genlerdir. Mikobakteriyel 16S rRNA geninde tüm mikobakteriler tarafından paylaşılan ortak dizilerin yanı sıra türe özgü değişkenlik gösteren çok değişken bölgeler de bulunmaktadır. Bu nedenle 16S rRNA geninin dizi analizi mikobakteri türlerinin tanımlanmasında başarıyla kullanılmaktadır^{1,2}.

Bu çalışmada balgam örneklerinden izole edilen pigment oluşturan iki mikobakteri suşu, çeşitli biyokimyasal özellikleri, yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) ile yapılan tüm hücre duvarı lipid analizleri, *hsp65* ve 16S rRNA geni dizi analizleri temel alınarak tanımlanmış ve mikobakterilerin taksonomisi ile ilgili güncel kaynaklar gözden geçirilerek tartışılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mikobakteri İzolatları: Mikobakteri izolatları 2002 ve 2003 yıllarında Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda iki farklı hastanın balgam örneğinden izole edildi. Kültür için Löwenstein-Jensen (LJ) ve MB/BacT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) besiyerleri kullanıldı. İzolatlar INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics NV, Ghent, Belgium) testiyle tür düzeyinde tanımlanamadı.

Biyokimyasal Testler: İzolatların koloni morfolojileri, üreme hızları, pigmentasyon ve farklı ısılarda (26°C, 37°C ve 42°C) üreme özellikleri LJ besiyerinde değerlendirildi. Biyokimyasal tanımlama için aril sülfataz, katalaz (ısıya duyarlı ve semikantitatif), nitrat redüktaz, üreaz, pirazin amidaz ve Tween 80 hidrolizi testleri kullanıldı³.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri: İlaç duyarlılık testleri %10 OADC ilave edilmiş 7H10 agarda amikasin, siprofloksasin, klaritromisin, doksisisiklin, imipenem, trimetoprim-sülfametoksazol şeritleri kullanılarak E-test (ABBioDisk, Solna, Sweden) yöntemiyle yapıldı.

HPLC Analizi: HPLC analizi İtalya'da Floransa Careggi Hastanesi Bölge Mikobakteri Referans Merkezi'nde yapıldı. Hücre duvarı mikolik asitleri bromofenaçil esterlerine çevrildikten sonra XL Ultrasphere sütunu (Beckman) içeren System Gold (Beckman, Palo Alto, USA) cihazında metanol ve metilen klorid⁴ gradienti yardımıyla analiz edildi. Elde edilen kromatografik paternler <http://www.MycobacToscana.it/page4.htm> adresinde HPLC kütüphanesinde bulunan paternlerle görsel olarak karşılaştırıldı.

DNA Dizi Analizi: Kültürde üreyen mikobakterilerden elde edilen genomik DNA'nın 16S rRNA geni 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (pozisyon 8 ile 28) ile 5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3' (pozisyon 1046 ile 1026) primerleri ve 5'-GTGTGGGTTTCCTTCCTTGG-3' (pozisyon 830 ile 847) ile 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (pozisyon 1542 ile 1522) primerleri, *hsp65* geninin 441 baz çift (bc)'lik bölgesi ise Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') ve Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCT-3') primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Daha sonra aynı primerler kullanılarak PCR ürünlerinin DNA dizileri oluşturuldu^{5,6}. DNA dizi analizi otomatize DNA sekans cihazı (Applied Biosystems 310, Foster City, CA) ile yapıldı.

Dizilerin Değerlendirilmesi: Elde edilen diziler BLAST programı kullanılarak GenBank'daki referans dizilerle karşılaştırıldı. DNA dizi homolojileri Lasergene 6 (DNASar, Inc) Editseq ve MegAlign programları yardımıyla saptandı. Filogenetik ağaç MegAlign programında Clustal W ile oluşturuldu.

Nükleotid Dizisi Kabul Numaraları: Nükleotid dizileri DDBJ/EMBL/GenBank veri tabanlarında AY379074, AY553874, DQ324791 ve DQ324792 kabul numaraları ile saklandı.

B U L G U L A R

Çalışılan iki suş iki farklı hastanın balgam örneklerinden izole edilmiştir. Beş yaşında bir çocuk hastanın balgam örneğinden elde edilen izolat E498 yalnız MB/BacT besiyerinde, 68 yaşında mezoteliomalı bir hastanın balgam örneğinden elde edilen izolat G1368 ise yalnız LJ besiyerinde üremiştir. Hastalardan alınan ikinci balgam örneklerinin kültürlerinde mikobakteri üremesi olmamıştır.

İzolatların asidorezistan boyanma özelliği gösterdiği, hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz olduğu, *Mycobacterium sp.* G1368'in kokobasil, *Mycobacterium sp.* E498'in ise basil yapısında olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). *Mycobacterium sp.* G1368'in 26°C'de üremediği, 37 ve 42°C'de 7 gün içinde düzgün kenarlı, sarı pigmentli koloniler oluşturduğu, üreyi hidrolize ettiği, nitrati indirgediği, 14 günlük aril sülfataz, pirazin amidaz, ısıya dirençli ve semikantitatif katalaz testlerinin pozitif, Tween 80 hidrolizinin ise zayıf pozitif olduğu, buna karşın *Mycobacterium sp.* E498'in 26 ve 42°C'de üremediği, 37°C'de 9 gün içinde düzgün kenarlı, sarı

pigmentli koloniler oluşturduğu, Tween 80'i hidrolize ettiği, 14 günlük aril sülfataz, ısıya dirençli katalaz testlerinin pozitif, üreaz ve nitrat indirgeme testlerinin ise negatif olduğu saptanmıştır (Tablo I).



Şekil 1: (A) *Mycobacterium sp.* E498 ve (B) *Mycobacterium sp.* G1368'in asidorezistan boyamaları ve LJ besiyerindeki koloni morfolojileri.

Tablo I: *Mycobacterium* İzolatlarının Fenotipik Özellikleri

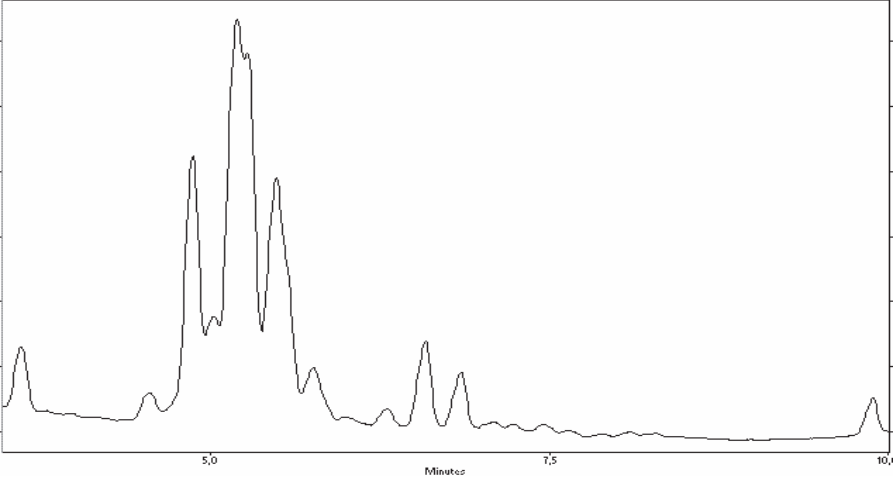
İzolat	ÜH (gün)	Üreme Isısı			Biyokimyasal Testler								
		26°C	37°C	42°C	PİG	ÜRE	PYR	TWE	NİT	ARY 3gün	ARY 14gün	KAT	SKAT
G1368	7	-	+	+	S (F)	+	+	+/-	+	-	+	+	+
E498	9	-	+	-	S	-	+	+	-	-	+	+	+/-*

ÜH: Üreme hızı, PİG: Pigmentasyon, ÜRE: Üreaz, PYR: Pirazin amidaz, TWE: Tween 80 hidroliz, NİT: Nitrat redüktaz, ARY: Aril sülfataz, KAT: 68°C katalaz, SKAT: Semikantitatif katalaz, *: 45mm, S: Skotokromojen, F: Fotokromojen.

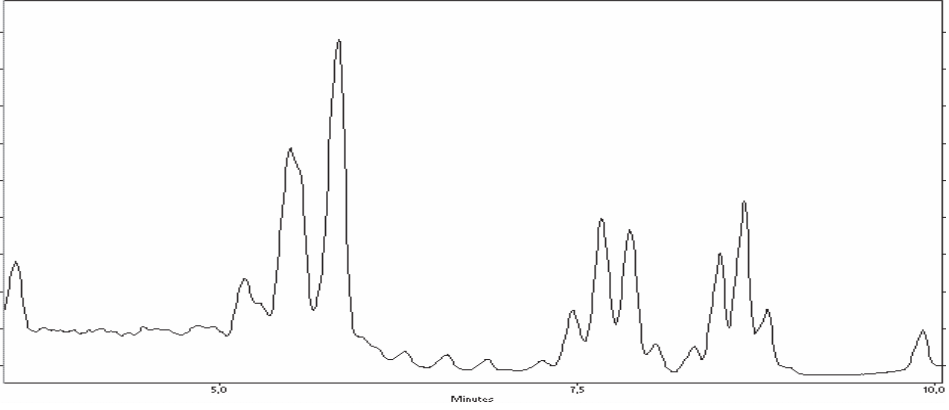
Mycobacterium sp. G1368 ve *Mycobacterium sp.* E498'in amikasin, siprofloksasin, klaritromisin, doksisisiklin, imipenem, trimetoprim-sülfametoksazol için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri Tablo II'de gösterilmiştir. *Mycobacterium sp.* G1368'in birincisi belirgin iki erken kümelenmeyle, *Mycobacterium sp.* E498'in ise üç ayrı kümelenmeyle karakterize tepelerden oluşan HPLC paterni gösterdiği saptanmıştır (Şekil 2a, 2b). Çalışmaya alınan izolatların *hsp65* geninin 441 bç'lik kısmının nükleotid dizileri tam olarak elde edilmiştir. Buna karşın 1534 bç'lik 16S rRNA geninde *Mycobacterium sp.* G1368'de 1392 bç, *Mycobacterium sp.* E498'de ise 1193 bç'lik bölümün nükleotid dizileri elde edilebilmiştir. DNA dizi homolojileri dikkate alınarak oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3'de gösterilmiştir.

Tablo II: *Mycobacterium* İzolatlarının Antibiyotik MİK Değerleri

Antibiyotik	MİK (µg/ml)	
	G1368	E498
Amikasin	0.75	0.125
Siprofloksasin	0.032	0.064
Klaritromisin	<0.016	<0.016
Doksisisiklin	<0.016	<0.016
İmipenem	0.023	0.002
Trimetoprim-sülfametoksazol	0.006	0.002

A) *Mycobacterium* sp. G1368.

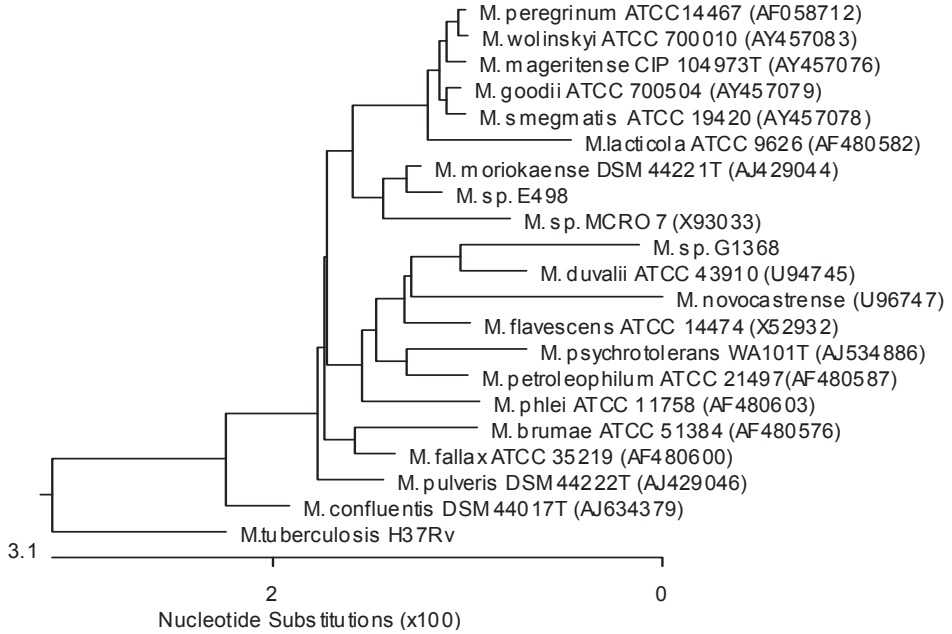
Şekil 2. (A) *Mycobacterium* sp. G1368 ve (B) *Mycobacterium* sp. E498'in HPLC kromatogramları.

B) *Mycobacterium* sp. E498.

Şekil 3. *Mycobacterium* sp. G1368, *Mycobacterium* sp. E498 ve genetik olarak ilişkili mikobakteri türlerinin 16S rDNA dizileri temel alınarak Clustal W ile oluşturulan filogenetik ağaç.

TARTIŞMA

Mycobacterium sp. G1368'in 16S rDNA'sının *Mycobacterium duvalii* ATCC 43910 ile 1392 bç'lik dizide 1375 nükleotid homolojisi gösterdiği, *Mycobacterium* sp. G1368'in en yakın dizi benzerliği gösterdiği 5 türün sırasıyla *M.duvalii* ATCC 43910 (%98.8), *M.goodii* ATCC 700504 (%98.2), *M.flavescens* ATCC 14474 (%98.1), *M.smegmatis* ATCC 19420 (%98), *M.phlei* ATCC 11758 (%97.8) olduğu



Şekil 3: *Mycobacterium sp.* G1368, *Mycobacterium sp.* E498 ve genetik olarak ilişkili mikobakteri türlerinin 16S rDNA dizileri temel alınarak Clustal W ile oluşturulan filogenetik ağaç.

saptanmıştır. Filogenetik ağaçta *Mycobacterium sp.* G1368'e en yakın pozisyonda yer alan *M. duvalii*'nin ayrıca üreme ısısı dışında birçok fenotipik özelliği de *Mycobacterium sp.* G1368'e benzemektedir⁹. İki tür arasında çok fazla nükleotid uyumsuzluğu olmasına karşın çok sayıda biyokimyasal özelliğinin ve HPLC profilinin benzeşmesi nedeniyle G1368'in *M. duvalii*'nin bir varyantı olma olasılığı ekarte edilememiştir. Bu çalışmada *hsp65* geni temel alındığında *Mycobacterium sp.* G1368'nin en yakın ilişkili olduğu mikobakteri türünün 401 bç'lik dizide 397 nükleotid homolojisi (%99) ile *Mycobacterium sp. variant* MS430 olduğu saptanmış, nükleotid değişikliklerinin konservatif olduğu ve amino asit değişikliğine yol açmadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda *hsp65* geninde amino asit değişikliğine yol açmayan nükleotid değişikliklerinin aynı türün farklı suşları arasında olabileceği gibi evrimsel olarak birbirine yakın farklı türler arasında da olabileceği bilinmektedir⁷. Buna karşın *Mycobacterium sp. variant* MS430'un biyokimyasal profili, üreme ısısı ve 16S rRNA geni dizisi bilgilerine ulaşılamadığından *Mycobacterium sp.* G1368 ile ayrımı yapılamamıştır⁸.

Mycobacterium sp. E498'in 16S rDNA'sının *M. moriokaense* DSM 44221T ile 1193 bç'lik dizide 1190 nükleotid homolojisi gösterdiği, *Mycobacterium sp.* E498'in en yakın dizi benzerliği gösterdiği 5 türün sırasıyla *M. moriokaense* DSM 44221T (%99.7), *M. fallax* ATCC 35219 (%99.2), *M. pulveris* DSM 44222T (%99.1), *M. brumae* ATCC 51384 (%98.8) ve *M. flavescens* ATCC 23008 (%98.7) olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada *hsp65* geni temel alındığında *Mycobacterium sp.* E498'in en yakın benzerliği *M.novocastrense* CIP 105546 (%95.2) ve *M.moriokaense* CIP 105393 (%94.6) ile gösterdiği ve 424 bç'lik dizide amino asit değişikliğine yol açan sırasıyla 20 ve 23 nükleotidin farklı olduğu saptanmıştır. *Mycobacterium sp.* E498'in biyokimyasal profilinin, üreme özelliklerinin ve HPLC paterninin *M.moriokaense*, *M.fallax*, *M.pulveris* ve *M.novocastrense* gibi genetik olarak yakın türlerden farklı olduğu belirlenmiştir¹⁰⁻¹³.

Günümüzde 16S rDNA dizi analizi, DNA-DNA hibridizasyonu ve protein kodlayan (housekeeping) genlerin dizi analizi yeni bir tür tanımlanırken kullanılan moleküler kriterlerdir. Bütün yeni tür tanımlamaları yaklaşık olarak tam bir 16S rDNA dizisi (1300-1500 nükleotit, <%0.5-1 belirsiz dizi) içermelidir. 16S rDNA dizi analizi ile birlikte RNA polimeraz enziminin beta alt ünitesini kodlayan *rpoB* geni (4000-4500 bç, <%1 belirsiz dizi) gibi protein kodlayan bir genin dizi analizinin yapılmasıyla daha güvenilir sonuçlar alınmaktadır. DNA-DNA hibridizasyonu ile aynı tür içinde DNA ilişkisinin en az %70, farklılığın ise %5'in altında olması istenmektedir. Buna karşın DNA-DNA hibridizasyonu her geçen gün daha az kullanılmaktadır^{1,2,14}. Yeni bir türün tanımlanabilmesi için gerekli olan 16S rRNA geni dizisindeki farklılığının oranı konusunda tam bir görüş birliği yoktur. Drancourt ve arkadaşları², 16S rRNA genleri arasındaki dizi benzerliği %97'den daha az olan iki bakteri izolatının farklı türlere ait olması gerektiğini, ancak aralarındaki dizi benzerliği %3'den daha az olan iki bakterinin ise kesin olarak aynı tür olduğu anlamına gelmediğini belirtmektedir. Bununla birlikte farklı türler arasında olması gereken en az dizi farklılığını %0.5, %1 veya %1.5 olarak kabul eden gruplar da bulunmaktadır^{2,15}.

Dizi analizi ile elde edilen veriler GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>), RIDOM (<http://www.ridom-rdna.de>) gibi elektronik veri tabanlarına aktarılmalıdır. Belli bir kalite kontrolü olmayan, genel kullanıma açık birçok veri tabanının aksine RIDOM Mycobacteria projesi (<http://www.ridom.de/mycobacteria/>), araştırmacılara mikobakteriyel 16S rDNA dizilerinin analizi için mükemmel bir serbest platform olanağı sağlamaktadır. Ayrıca bu sitede mikobakterilerin fenotipik özelliklerine ilişkin veriler de bulunmaktadır^{1,2}.

Yeni bir mikobakteri türünün tanımlanması için yalnız 16S rRNA geninin dizisinin bilinmesi yeterli değildir. Yeni bir tür tanımlanırken bazı temel ve ayırt ettirici fenotipik özellikler de tanımlanmalıdır. Üreme ısısı, üreme hızı, pigmentasyon tipi, boyanma özellikleri, koloni morfolojileri, hareket, spor oluşturma ve elektron mikroskopideki boyutları gibi özelliklere ek olarak hızlı üreyen mikobakterilerde NaCl toleransı ve McConkey'de üreme, yavaş üreyen mikobakterilerde ise 3 ve 14 günlük aril sülfataz testi, nitrit indiregeme, Tween 80 hidrolizi, üre hidrolizi, 68°C katalaz ve semikantitatif katalaz gibi biyokimyasal testler de kullanılmalıdır. Hücre duvarının lipid analizi, günümüzde tür tanımlaması için kullanılan fenotipik yöntemlerden biridir. Bu amaçla HPLC, TLC (thin-layer chromatography) ve GLC (gas-liquid chromatography) gibi teknikler kullanılmaktadır. HPLC oldukça ayırıcı bir teknik olmasına karşın özellikle benzer profiller gösteren hızlı üreyen mikobakteri türlerinde sorunlar yaşanabilmektedir. Ayrıca izolatların amikasin, tobramisin, imipenem, doksisisiklin, klaritromisin,

siprofloksasin, sefoksitin, trimetoprim-sülfametoksazol gibi antibiyotiklere karşı duyarlılık profilleri de bildirilmelidir. İzolasyonun kaynağı, klinik örneklerde örneğin elde edildiği doku, izole edilen bakterinin etken olup olmadığı bildirilmeli, immün süpresyon ve kuşku bir bulaşma öyküsü araştırılmalıdır. Kaviter veya kaviter olmayan akciğer hastalığı olan bir bireyden izole edilen bir tüberküloz dışı mikobakterinin en az iki klinik örneğin kültüründe belli bir koloni sayısının üstünde üremesi, etken kabul edilebilmesi için gerekli minimum kriter olarak kabul edilmektedir^{1,2}.

Yeni bir mikobakteri türünün tanımlanması için gerekli olan minimum izolat sayısı konusunda henüz tam bir görüş birliği bulunmamaktadır. "International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology" (eski adı; International Journal of Systematic Bacteriology) dergisinde 1990-2000 yılları arasında tür ve cins düzeyinde isim alan izolatların sayısı sırasıyla yaklaşık 4 ve 7 kat artmıştır. Yalnız tek bir izolat ile yapılan yeni isimlendirme her iki kategoride de yaklaşık %40'dır. Literatürde 1990-2000 yılları arasında yalnız tek izolat temel alınarak yeni tür ismi verilen mikroorganizmaların yaklaşık %1.5'inin daha sonra yeniden sınıflandırılması gerekmiştir. Bakteriye taksonominin kalitesinde sorunlar yaratması nedeniyle günümüzde yeni bir tür veya cins tanımlanması için farklı coğrafik ve ekolojik kaynakları gösteren veya farklı bireylerden, bağımsız olarak izole edilmiş en az 5 suşun genotipik ve fenotipik olarak iyi karakterize edilmesi istenmektedir. Ayrıca yeni tanımlanmış mikobakterinin iki ayrı laboratuvar tarafından bağımsız olarak doğrulanması önerilmektedir^{2,16}.

Yeni bir bakteriyi tanımlayan araştırmacıların, bakterinin adını belirleme ayrıcalığına sahip olmaları gerektiği konusunda görüş birliği vardır. Bakteriye bulunduğu veya izole edildiği coğrafi bölgenin adı veya onun kaynağını, patojenitesini, bulaşmasını ve antibiyotik duyarlılığını gösteren kelimenin Latinceleştirilmiş şekli verilebilmektedir. Bununla birlikte bakteri izole edildiği hastanın isminden köken almamalıdır. Ayrıca yalnız kültürde üretilen bakterilere isim verilmesi ve yeni tanımlanan bakterinin Amerika Birleşik Devletleri (American Type Culture Collection) ve Avrupa ülkelerin ulusal koleksiyonları gibi uluslararası kültür koleksiyonu merkezlerinde saklanması önerilmektedir².

Yalnız 16S rRNA geninin dizisinin GenBank veya benzer veri tabanlarında saklanması yeni bir türün tanımlanması için yeterli değildir. Yeni tanımlanan bir türün bilimsel topluluk tarafından kabul görmesi için bulguların uluslararası hakemli bir taksonomi dergisinde yayınlanması gerekmektedir. Son yıllarda kabul gören en az 5 izolat kuralı, tek izolat ile yapılan yeni tür tanımlamalarının uluslararası hakemli dergilerde yayınlanma olanağını ortadan kaldırmıştır. Ancak alışılmadık genotip ve/veya fenotipe sahip tüm mikobakterilerin rapor edilmesi de bir zorunluluktur. Bu nedenle son yıllarda klinik mikrobiyologların yeni bulunan bakteri türü hakemli dergilerde yayınlanana kadar bu "orphan" izolatları *Candidatus* adı altında bir isimle bildirebilecekleri internet tabanlı depoların yaratılması önerilmektedir. Bu amaçla Amerikan Mikrobiyoloji Cemiyeti önderliğinde Elektronik Yetim Bakteri Deposu (Electronic Orphan Bacterium Repository; EOBR) kurularak izolatın saklandığı koleksiyonlar ve koleksiyon numarası, izolasyonun kaynağı, GenBank kabul numarası, tam 16S rRNA dizisi ve en yakın 5 türle arasındaki dizi benzerliğinin

yüzdesi, belirli fenotipik özellikleri, diğer anlamlı gen dizileri ve GenBank kabul numaraları, en az iki sorumlu araştırmacının adı ve adresi gibi bilgilerin bu elektronik ortamada saklanması önerilmektedir. Böylece yeni türlerin hakemli dergilerde yayınlanması beklenmeden araştırmacılar tarafından bilgilere ulaşılabilecek ve temelde mantıklı olan 3-5 izolat kuralı da normalize edilebilecektir².

Bu çalışmada incelenen izolatların hücre duvarı lipid analizi, üreme ve biyokimyasal özellikleri, antibiyotik duyarlılıkları ile 16S rDNA ve *hsp65* gen dizileri gibi genotipik özellikleri tanımlanmıştır. *Mycobacterium sp.* G1368'in 16S rRNA geninin 1392 bç'lik, *Mycobacterium sp.* E498'in ise 1193 bç'lik bölümünün nükleotid dizileri elde edilmiş, *Mycobacterium sp.* G1368'in en yakın türle arasında %1.2, *Mycobacterium sp.* E498'in ise %0.3 dizi farklılığı bulunmuştur. Bu çalışmada incelenen izolatlar, yukarıda sözü edilen kriterlere göre hastalık etkeni olarak değerlendirilmemiştir.

Sonuç olarak, fenotipik ve genotipik özellikleri ve filogenetik ağaçtaki pozisyonları özellikle *Mycobacterium sp.* G1368'in yeni bir tür olabileceğini desteklemektedir. Hastalardan birer kez izole edildiği ve hastalıkla ilişkili oldukları kanıtlanmadığı için, mikobakterilerin taksonomisindeki son yıllardaki görüşler doğrultusunda bu izolatlara yeni tür isimleri verilmemiş, ancak fenotipik ve genotipik özellikleri tanımlanan bu izolatlar yeni aday mikobakteri türleri olarak değerlendirilmiştir.

TEŞEKKÜR

Yardımları için teknisyen Onur Uğur, Yüksel Akbaş ve Dr. Ajda Turhan'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 319-54.
2. Drancourt M, Raoult D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4311-5.
3. Kent PT, Kubica GP. Public health laboratory. A guide for the level III laboratory. 1985. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta.
4. Centers for Disease Control. Standardized method for HPLC identification of mycobacteria. 1996. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta.
5. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 175-8.
6. Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 1989; 19:7843-53.
7. Çavuşoğlu C, Turhan A, Yaygın YE, Karaca Dericci Y, Bilgiç A. Tüberküloz dışı mikobakteri izolatlarının tanımlanmasında INNO-LiPA Mycobacteria v2 ve *hsp65* dizi analizinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39: 437-45.
8. McNabb A, Eisler D, Adie K, et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3000-11.

9. Stanford JL, Gunthorpe WJ. A study of some fast-growing scotochromogenic mycobacteria including species description of *Mycobacterium gilvum* (new species) and *Mycobacterium duvalii* (new species). Br J Exp Pathol 1971; 52: 627-37.
10. Tsukamura M, Yano I, Imaeda T. *Mycobacterium moriokaense* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacterium. Int J Syst Bacteriol 1986; 36: 333-8.
11. Lévy-Frébault V, Rafidinarivo E, Promé JC, et al. *Mycobacterium fallax* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1983; 33: 336-43.
12. Tsukamura M, Mizuno S, Toyama H. *Mycobacterium pulveris* sp. nov., a nonphotochromogenic mycobacterium with an intermediate growth rate. Int J Syst Bacteriol 1983; 33: 811-5.
13. Shojaei H, Goodfellow M, Magee JG, et al. *Mycobacterium novocastrense* sp. nov., a rapidly growing photochromogenic mycobacterium. Int J Syst Bacteriol 1997, 47: 1205-7.
14. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol 2002; 52: 1043-7.
15. Clarridge JE III. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 840-67.
16. Christensen H, Bisgaard M, Frederiksen W, Mutters R, Kuhnert P, Olsen JE. Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 revision). Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 2221-5.