

# ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEN TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKOBAKTERİLERİN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI

## IDENTIFICATION AND ISOLATION OF NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA FROM ENVIRONMENTAL SAMPLES

Uğur CAFRI<sup>1</sup>, Gönül ASLAN<sup>2</sup>, Şahin DİREKEL<sup>2</sup>, Gülnur TARHAN<sup>3</sup>, İsmail CEYHAN<sup>3</sup>,  
Gürol EMEKDAŐ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin. (drgaslan@gmail.com)

<sup>2</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

<sup>3</sup> Refik Saydam Hfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara.

### ÖZET

Doğada ve çevrede yaygın olarak bulunan tüberküloz dışı mikobakteriler (nontuberculous mycobacteria; NTM), özellikle immün sistemi baskılanmış konaklarda fırsatçı enfeksiyonların en önemli nedenlerindedir. Bu çalışmada, Mersin’de toprak, çiğ süt ve su dağıtım sistemlerinden alınan örneklerden NTM izolasyonu ve tanımlanması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Kasım 2003-Mayıs 2004 tarihleri arasında Mersin ili içinden ve çevresinden toplanan 101 su, 124 toprak ve 40 süt örneği dahil edilmiştir. Su örnekleri, 29 farklı su dağıtım sisteminden; toprak örnekleri, Mersin ve çevresindeki çeşitli park ve bahçelerden; süt örnekleri ise değişik bölgelerde pazarlanan çiğ sütlerden toplanmıŐtır. Örnekler homojenizasyon ve dekontaminasyon iŐlemi uygulandıktan sonra aside dirençli boyama ve Löwenstein-Jensen besiyerinde kültür yapılarak aside dirençli bakteriler araŐtırılmıŐtır. Kültürden izole edilen aside dirençli bakteriler, polimeraz zincir reaksiyonu temelli RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve INNO-LIPA Mycobacteria yöntemleri ile tanımlanmıştır. Çalışmamızda, su örneklerinin %4.9 (5/101)’unda ve toprak örneklerinin %0.8 (1/124)’inde kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile NTM pozitifliği saptanırken, çiğ süt örneklerinin hiçbirisinde NTM tespit edilmemiştir. Su örneklerinden izole edilen NTM suşlarının üçü, PCR-RFLP ve INNO-LIPA Mycobacteria yöntemleri ile *Mycobacterium chelonae* tip III, ikisi *Mycobacterium kansasii* tip II olarak; toprak örneğinden izole edilen bir suş ise *Mycobacterium fortuitum* olarak tanımlanmıştır. NTM varlığı saptanan beŐ su örneğinin ikisinin hastane musluk suyu örnekleri olduğu dikkati çekmiştir. Sonuç olarak, özellikle hastanelerde su ve çevresel ortamların NTM ile kontaminasyon/kolonizasyonu, nozokomiyal enfeksiyonlar için potansiyel risk oluŐturduđundan, su sistemleri ve tıbbi donanımların sürveyans kültürlerinin yapılması, kaynağın en kısa sürede belirlenmesi, izolatların tanımlanması ve tiplendirilmesinin, etkili kontrol önlemlerinin (uygun sterilizasyon/dezenfeksiyon yöntemleri, su sistemlerinin bakımı ve modernizasyonu vb.) alınması için gerekli olduğu düşünölmüŐtür.

**Anahtar sözcükler:** Atipik mikobakteri, tüberküloz dışı mikobakteri, su, toprak, çiğ süt, Türkiye.

**ABSTRACT**

Non-tuberculous mycobacteria (NTM) found frequently in tap water and environment cause important opportunistic infections in immunocompromised patients. The aim of this study was to isolate and identify non-tuberculous mycobacteria in soil, raw milk and water distribution system samples in Mersin (a province located at Mediterranean region of Turkey). A total of 101 water, 124 soil and 40 milk samples collected from the central part and suburban parts of Mersin during November 2003-May 2004 period were included in the study. Water samples were collected from 29 different water distribution systems; soil samples from different parks and gardens and milk samples from raw milks sold at different districts. After the samples were processed by homogenization and decontamination, acid-fast staining and culture into Löwenstein-Jensen medium were performed. Acid-fast bacilli isolated from culture medium were identified by using conventional methods, polymerase chain reaction (PCR)-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) and INNO-LIPA Mycobacteria methods. NTM were identified from 4.9% (5/101) of water samples and 0.8% (1/124) of soil samples by culture and PCR. No NTM were detected in the raw milk samples. Three of the NTM strains isolated from water samples were defined as *Mycobacterium chelonae* type III and two as *Mycobacterium kansasii* type II. One NTM strain isolated from soil was defined as *Mycobacterium fortuitum*. It was of note that two of the five NTM positive water samples were tap water samples collected from hospitals. It was concluded that NTM colonization/contamination of water and environment in the hospitals was a potential risk factor in terms of nosocomial infections. Thus surveillance cultures of the water systems and the medical devices in the hospital are necessary to fix the source of NTM, to identify and type the strains and to establish effective control measures such as sterilization, disinfection, maintenance and modernization of water systems.

**Key words:** Atypical mycobacteria, non-tuberculous mycobacteria, water, soil, raw milk, Turkey.

**GİRİŞ**

Endüstrileşmiş dünyanın değişik bölgelerinde, tüberküloz dışı mikobakterilerin (non-tuberculous mycobacteria; NTM), diğer bir deyişle atipik mikobakterilerin neden olduğu enfeksiyonların sayısı giderek artmaktadır<sup>1</sup>. NTM, su, toprak, besinler, toz ve aerosoller içeren tüm doğal ekosistemlerde yaygın olarak bulunur ve çevresel kaynaklardan insana sindirim, inhalasyon ve inokülasyon yoluyla bulaşabilir<sup>1-3</sup>. Bu mikroorganizmalar, özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde fırsatçı patojen olabilmekte ve lokalize kütanöz lezyonlar, pulmoner enfeksiyonlar, lenfadenit ve yaygın enfeksiyonlara yol açabilmektedir.

Hem hastadan hem de kaynaktan aynı mikobakteri türü izole edildiği zaman geçiş yolu belirlenebilir; ancak çoğu zaman mikobakteriler, varsayılan enfeksiyon kaynaklarından nadir olarak izole edilir<sup>4,5</sup>. NTM insanlarda önemli morbidite ve mortalite nedeni olmasının yanı sıra tarımda da önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır<sup>2</sup>. NTM'ler sağlık bakım ünitelerinde oldukça yaygın kolonizasyon gösterdiğinden hastane kaynaklı salgınlara neden olabileceği vurgulanmaktadır. Kullanılan tıbbi cihazların yetersiz sterilizasyonu, steril olmayan cihazların kullanımı ve su sistemlerinin bakımsızlığına bağlı olarak hastane kaynaklı mikobakteri enfeksiyonlarında *Mycobacterium xenopi* ve *Mycobacterium kansasii* sıklıkla izole edilmektedir. Son yıllarda atipik mikobakterilerden kaynaklanan hastane enfeksiyonlarının sayısının gittikçe arttığı da belirtilmiştir. Uzun süre içme suyu sistemlerinde kalabilen mikobakteriler yaygın kullanılan dezenfektanlara, geniş pH ve sıcak-

lık aralığına direnç göstermektedir. Daha da önemlisi, çevresel mikobakteriler biyofilm oluşturarak (*Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*) mikobakteri popülasyonunun, su dağıtım sisteminde sürekli kalmasını sağlamaktadır<sup>2,6</sup>.

Bu çalışmada, Mersin bölgesinde toprak, çiğ süt ve su dağıtım sistemlerinden alınan örneklerde NTM izolasyonu ve tanımlanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Örnekler

Çalışmaya, Kasım 2003-Mayıs 2004 tarihleri arasında Mersin ili içinden ve çevresinden toplanan 101 su, 124 toprak ve 40 süt örneği dahil edildi. Su örnekleri, 29 farklı su dağıtım sisteminden (Mersin iline içme suyu sağlayan Berdan Barajı, işlenmiş kaynak suları, hastane musluk suları ve su depoları), içinde kloru nötralize etmek için 2 g sodyum sülfat bulunan 1 litrelik geniş ağızlı steril plastik şişelere toplandı. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilen örnekler aynı gün işleme alındı. Bir litrelik su örnekleri membran filtreden (por çapı 0.45 µm; Milipore) süzüldü ve membran alınarak içerisinde 10 ml buyyon bulunan steril tüplere konuldu. Örneklerin işlenmesi daha önce tanımlanan yöntemle<sup>7,8</sup> göre yapıldı.

Toprak örnekleri, Mersin ve çevresindeki çeşitli park ve bahçelerden yaklaşık 5 g olacak şekilde toplandı. Örnekler 10 ml adi buyyon içinde süspansiyon edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 37°C'de 6 saat inkübe edilen örnekler, 4°C'de 10 dakika 1500xg'de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak daha önce tanımlandığı<sup>8,9</sup> şekilde işlemlendi.

Çiğ süt örnekleri, Mersin'in değişik bölgelerinden her birisi birer lt'lik örneklemeler halinde 40 ml olacak şekilde toplandı. 6 ml %10 trisodyum fosfat ve 4 ml %0.1 benzalkonium klorid ile dekontamine edildikten sonra oda ısısında 20-30 dakika çalkalandı. 4°C'de 5000xg'de 30 dakika santrifüj edildi, süpernatant alındı ve daha önce tanımlandığı<sup>10</sup> şekilde işlemlendi.

### Kültür

Homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinden sonra tüm su, toprak ve süt örnekleri, Löwenstein-Jensen (LJ) ve sikloheksimid, nalidiksik asit ve linkomisin eklenmiş seçici LJ (BioMerieux-France) besiyerlerine ekildi. 35-37°C'de 6 hafta süreyle inkübe edilen besiyerleri 3 günde bir kontrol edildi ve üreme varlığında litredeki koloni sayısı ve koloni morfolojisi kaydedildi. Üreyen koloniler Ziehl-Neelsen ve Auramin boyama yöntemleriyle boyanarak incelendi ve aside dirençli basil saptanması durumunda LJ besiyerine pasajları yapılarak moleküler yöntemler ile ileri değerlendirmeye alındı.

### Moleküler Tanımlama

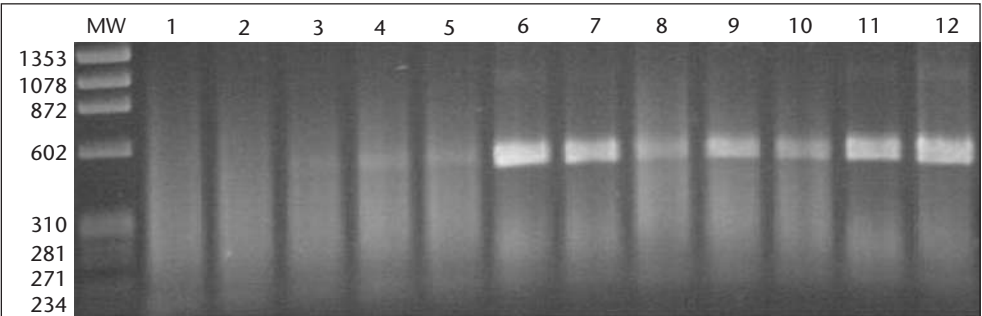
Mikobakterilerin moleküler olarak tanımlanması, 65 kDa büyüklüğündeki ısı şok proteini (*hsp*) geninin polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) ile gösterilmesi sonucu gerçekleştirildi. Tür düzeyinde tanımlama için, 439 baz çiftlik ürünlerin HaeIII ve BstEII restriksiyon enzimleriyle kesimi yapıldı.

Örneklerden DNA ekstraksiyonu daha önce tanımlandığı şekilde yapıldı<sup>11</sup>. Kısaca; LJ besiyerinde üreyen kolonilerden 10 µl tek kullanımlık öze ile alınarak 10 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA (pH: 8.0) içeren 500 µl Tris-EDTA solüsyonu ile süspanse edildi. 80°C'lik ısı bloğunda 10 dakika bekletilen örnekler 13.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökelti, 200 µl TE solüsyonu ile iki kez yıkandı ve aynı solüsyonun 200 µl'si ile tekrar sulandırıldı. Kaynayan sıcak su banyosunda 20 dakika inkübasyondan sonra, örnekler tekrar 13.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve DNA içeren süpernatantlar alınarak kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

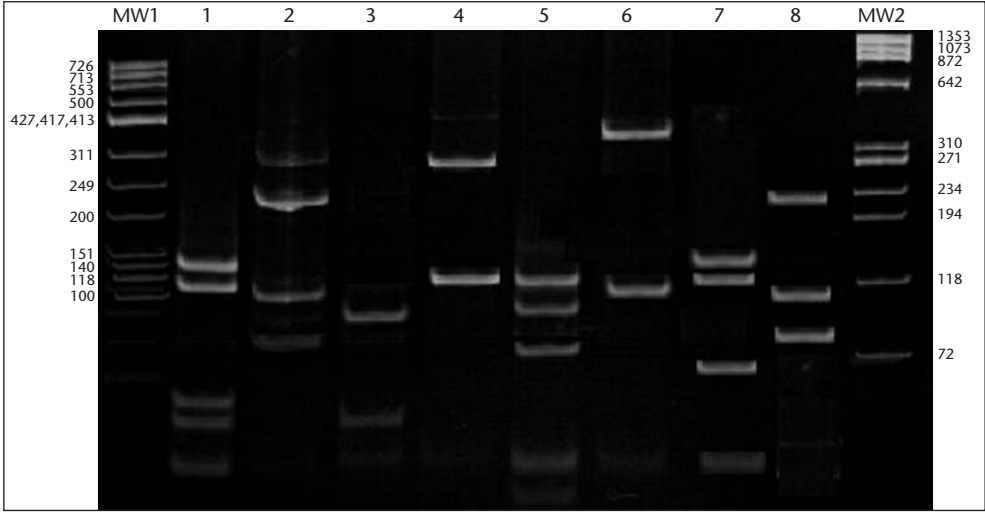
Amplifikasyon için; 10 µl DNA 1x PCR tamponu (Epicentre Technologies, ABD), PCR-Enhancer (1X), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Epicenter Technologies, ABD), 200 µM dNTP (Epicentre Technologies, ABD), 50 pM/µl primer Tb 11 (5'-ACCAACGATGGTGTGCCAT) ve 50 pM/µl Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT), 2.5 U/µl Taq DNA polimeraz (Epicentre Technologies, ABD) içeren 50 µl reaksiyon karışımı kullanılarak PCR yapıldı<sup>12</sup>. Reaksiyon tüpleri ilk olarak 94°C'de 3 dakika ısıtıldı, sonra 44 amplifikasyon döngüsü (1 dakika 94°C, 1 dakika 58°C, 1 dakika 30 saniye 72°C) uygulandı. 72°C'de 4 dakika uzama için bekletildikten sonra amplifikasyon ürünleri %1.5 agaroz jelde (A8455; Sigma, ABD) yürütülerek etidyum bromür ile boyandı ve UV lambası altında değerlendirildi (Resim 1).

PCR ürünlerinin restriksiyon fragment analizi için *BstEII* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri kullanıldı. Her iki enzim için 11.5 µl H<sub>2</sub>O, 0.5 µl (5U) enzim ve 2.5 µl restriksiyon solüsyonu hazırlandı. Karışıma direkt olarak 20 µl PCR ürünü eklendi. Karışım 60°C'de *BstEII* ve 37°C'de *HaeIII* enzimleriyle bir gece inkübe edildi<sup>13,14</sup>. Restriksiyon fragmentlere %8'lik poliakrilamid jelde elektroforez uygulandı. Fragmentler etidyum bromür ile boyandı ve Ergin ve arkadaşlarının<sup>14</sup> referans algoritmasına göre yorumlandı. Moleküler standart olarak "*HaeIII*-digested φX 174" ve "*Hinfl*-digested φX 174" DNA'ları kullanıldı (Resim 2).

Çalışmada elde edilen sonuçlar ayrıca "Line Prob" testi (INNO-LIPA Mycobacteria; Inogenetics NV, Belçika) ile de doğrulandı. Bu amaçla mikobakteri DNA'sı LJ ve selektif LJ'de üreyen izolatlardan ekstrakte edildi. PCR; 5 µl DNA ekstraktı, dNTP (D59104; Epicentre Technologies, ABD), biotinlenmiş primer ve Taq DNA polimeraz içeren 50 µl re-



**Resim 1.** PCR ürünlerinin görüntüsü. MW: Moleküler ağırlık belirteci (*HaeIII*-digested φX 174 DNA); Hat 1 ve 2: Negatif kontrol; Hat 3-12: Kültür pozitif su ve toprak örnekleri.



**Resim 2.** NTM'nin PCR-RFLP kalıpları. MW1:  $\phi$ X174 DNA *Hinf*I; MW2:  $\phi$ X174 DNA *Hae*III; Hat 1, 3, 5, 7: RFLP *Hae*III enziminin kalıpları; Hat 2, 4, 6, 8: RFLP *Bst*EII enziminin kalıpları; Hat 1 ve 2: *M.fortuitum*; Hat 3 ve 4: *M.chelonae*; Hat 5 ve 6: *M. kansasii*; Hat 7 ve 8: *H37Rv*.

aksiyon karışımı kullanılarak yapıldı. Biotin işaretli PCR ürünleri denatüre edildi ve 14 özgül oligonükleotid prob ile (MYC'ye özgül prob, MTB'ye özgül prob ve MKA1, MKA3, MXE, MGO, MAIS, MAV, MIN, MSC, MCH1, MCH3 probları) bir stripte hibridize edildi (INNO-LIPA Mycobacterium v2 sribi üzerinde farklı oligonükleotid problemlerinin pozisyonları Resim 3'te görülmektedir). Hibridize edilen PCR ürünleri tespit edildi ve LIPA sonuçları üreticinin (Innogenetics NV, Belçika) önerilerine göre pembe/kahverengi bantların görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Tüm çalışmalarda kontrol olarak *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 standart suşu kullanıldı.

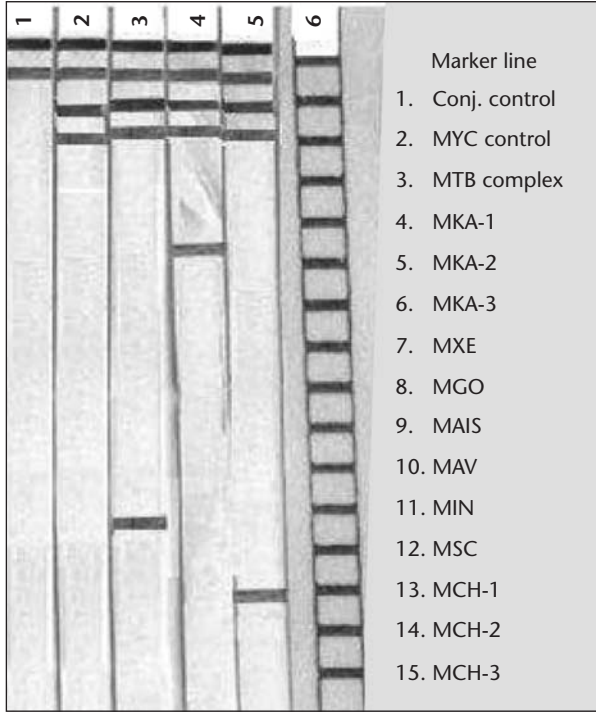
## BULGULAR

Çalışmamızda, 101 su örneğinin 5 (%4.9)'ünde ve 124 toprak örneğinin 1 (%0.8)'inde kültür ve PCR ile NTM pozitifliği saptanırken, çiğ süt örneklerinin hiçbirisinde NTM tespit edilmemiştir.

NTM varlığı saptanan 5 su örneğinin ikisi hastane musluk suyu örnekleridir. LJ besiyerinde su örneklerinden NTM izolasyon süresi 18-23 gün (ortalama 18.5) arasında değişiklik göstermiştir.

Su örneklerinden LJ besiyerinde izole edilen NTM suşlarının 3'ü, PCR-RFLP ve INNO-LIPA Mycobacteria testi ile *M.chelonae* tip III, ikisi ise *M.kansasii* tip II olarak tanımlanmıştır (Resim 1-3).

LJ besiyerinde 7. günde NTM üremesi olan bir toprak örneğinden izole edilen suş ise moleküler yöntemlerle *M.fortuitum* olarak tanımlanmıştır (Resim 2,3).



**Resim 3.** NTM'nin INNO-LIPA sonuçları. 1: Negatif kontrol; 2: Pozitif kontrol; 3: *M.fortuitum*; 4: *M.kansasii* Grup II; 5: *M.chelonae* Grup I.

## TARTIŞMA

Musluk suyundan kaynak alan mikobakterilerin insan vücudunda kolonizasyon veya enfeksiyona yol açmasında etkili olduğunu ileri süren çalışmalar gittikçe artmaktadır<sup>3,5,15-17</sup>. *M.kansasii*, *M.fortuitum*, *M.chelonae*, *Mycobacterium avium* ve *M.xenopi* gibi etkenlerin hastalardan ve kontaminasyona neden olduğu düşünülen musluk suyundan aynı anda izole edildikleri bildirilmektedir<sup>5</sup>. Son yıllarda NTM, kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS) olan hastalarda fırsatçı enfeksiyonların en önemli nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır<sup>15</sup>.

Mikobakteriler, cerrahi veya klinik araştırmalarda kullanılan ekipmanların yetersiz sterilizasyon veya dezenfeksiyonu sonucu kolonize olabilmekte ve nozokomiyal enfeksiyonlar için kaynak oluşturmaktadır. Atipik mikobakterilerin hemodiyaliz sıvılarında, farmasötik preparatlarda ve dezenfektan solüsyonlarında kontaminant olarak bulunabildiği ve buna bağlı olarak, *M.fortuitum* ve *M.chelonae*'nin kardiyak cerrahi sonrası ortaya çıkan endokardit ve ciddi yaralanma sonrası gelişen enfeksiyonlardan; *M.xenopi*, *M.kansasii* ve *M.fortuitum*'un ise eklem içi steroid enjeksiyonu sonrasında gelişen septik artritis ve osteomyelitten sorumlu olduğu bildirilmektedir<sup>6</sup>. Nadiren sağlıklı kişilerde, kontamine solüsyon enjeksiyonundan sonra lokal enfeksiyonların yanı sıra yaygın hastalıklar da ortaya çıkabilmektedir<sup>6</sup>. Grubek-Jaworska ve arkadaşları<sup>1</sup> 1999-2005 yılları arasında inceledikleri

4192 hasta örneğinin 445'inde mikobakteri varlığı tespit etmişler; bunlardan 142'sinin *M.tuberculosis*, 303'ünün ise NTM olduğunu belirlemişler ve NTM izolatlarının %8.9 (27/303)'unu akciğer enfeksiyonu etkeni, diğerlerini (%91.1) ise çevresel kontaminasyon veya kolonizasyon olarak değerlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar, pulmoner enfeksiyon ile ilişkili NTM'nin akciğer tüberkülozlu hastaların yaklaşık 1/5'i kadar olduğu sonucuna varmışlardır<sup>1</sup>.

Çalışmamızda, incelenen su örneklerinde NTM pozitiflik oranı %4.9 (5/101) olarak saptanmış olup, bu suşların 2 (%1.9)'sinin hastane örneklerinden izole edildiği dikkati çekmiştir. Bu durumun, hastanenin su dağıtım sisteminin eski oluşu ve bakım eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Kültürden izole edilen NTM suşlarının üçü PCR-RFLP ve INNO-LIPA yöntemleri ile *M.chelonae*, ikisi ise *M.kansasii* olarak tanımlanmıştır. Bu bulgu da, Mersin'de su temin ve dağıtım sistemlerinin *M.chelonae* ve *M.kansasii* ile kolonize olduğunu düşündürmektedir. Su örneklerinde saptadığımız NTM pozitiflik oranı (%4.9), Narang ve arkadaşları<sup>17</sup> tarafından bildirilen (%15) orandan düşük olup, İstanbul'dan Akbal<sup>18</sup> tarafından bildirilen orana (%6.6) benzerdir.

Toprak örneklerinden genellikle *M.fortuitum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium terrae* ve *Mycobacterium phlei* gibi hızlı üreyen mikobakteri türleri izole edilmektedir<sup>19-21</sup>. Mikobakterilerin, az oksijen içeren ve pH'sı düşük olan topraklarda daha sık bulunduğu belirtilmektedir<sup>9</sup>. Akbal'ın<sup>18</sup> çalışmasında, toprak örneklerinde NTM pozitifliği %80 (16/20) gibi yüksek bir oranda elde edilmiş ve izolatların hepsi *M.gordoniae* olarak tanımlanmıştır. Narang ve arkadaşları<sup>17</sup> da 20 toprak örneğinin 15 (%75)'inden NTM izole etmişlerdir. Bizim çalışmamızda incelenen 124 toprak örneğinin ise sadece 1 (%0.8)'inde NTM saptanmış ve bu izolat da *M.fortuitum* olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda elde edilen bu oran diğer çalışmalara göre oldukça düşük bulunmuş; bu durumun iklim ve toprak yapısının farklı olması ya da örneklemeden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Süt örneklerinde yapılan çalışmalarda da NTM kontaminasyonu bildirilmektedir<sup>10,22-24</sup>. Leite ve arkadaşlarının<sup>22</sup> çalışmasında, süt örneklerinden mikobakteri izolasyon oranı %18 (23/128) olarak saptanmıştır. Bu oran, pastörize süt örnekleri için %22.5 ve çiğ süt örnekleri için %16.7 iken, UHT uygulanmış süt örneklerinde mikobakteri bulunmamıştır<sup>22</sup>. Süt örneklerinden en sık izole edilen türlerin ise *M.fortuitum*, *M.gordoniae* ve *Mycobacterium marinum* olduğu ifade edilmiştir<sup>22</sup>. Junior ve arkadaşları<sup>23</sup> da, peynir üretiminde kullanılan çiğ sütlerde %21.7 (5/23) oranında NTM tespit ettiklerini bildirmişlerdir<sup>23</sup>. Ülkemizde Konuk ve arkadaşlarının<sup>24</sup> Afyonkarahisar bölgesinde yaptıkları çalışmada, 35 çiğ süt örneğinin 15'inde aside dirençli bakteri gözlenmiş; PCR-RFLP analizi ile suşların altısı *M.terrae*, üçü *M.kansasii*, üçü *Mycobacterium haemophilum*, biri *Mycobacterium agri* olarak tiplendirilirken iki izolat tiplendirilememiştir<sup>24</sup>. Buna karşın Akbal'ın<sup>18</sup> İstanbul bölgesinde yaptığı çalışmada, çiğ ve pastörize süt örneklerinde NTM pozitifliği tespit edilememiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da çiğ süt örneklerinde NTM varlığına rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, özellikle hastanelerde su ve çevresel ortamların NTM ile kontaminasyon/kolonizasyonu, başta immün sistemi baskılanmış hastalar olmak üzere hastanede

yatan hastalar için büyük risk oluşturmaktadır<sup>25</sup>. Dolayısıyla NTM'ye bağlı nozokomiyal enfeksiyonlarla mücadele amacıyla, su sistemleri ve tıbbi donanımların sürveyans kültürlerinin yapılması, kaynağın en kısa sürede belirlenmesi, izolatların tanımlanması ve tiplendirilmesi ve etkili kontrol önlemlerinin alınması (uygun sterilizasyon/dezenfeksiyon yöntemleri, su sistemlerinin bakımı ve modernizasyonu vb.) gerekliliği açıktır.

## KAYNAKLAR

1. Grubek-Jaworska H, Walkiewicz R, Safianowska A, et al. Nontuberculous mycobacterial infections among patients suspected of pulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 739-44.
2. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health impacts of environmental Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 98-106.
3. Falkinham JO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment *J Appl Microbiol* 2009; 107: 356-67.
4. Choudhri S, Manfreda J, Wolfe J, Parker S, Long R. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolates in a Canadian tertiary care center. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 128-33.
5. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5318-25.
6. Phillips MS, Von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1363-74.
7. Goslee S, Wolinsky E. Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113: 287-92.
8. Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Chauhan A, Chauhan SV, Katoch VM. Optimization of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in northern India. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 3751-3.
9. Brooks RW, Parker BC, Gruft H, Falkinham, JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 630-3.
10. Chapman JS, Speight M. Isolation of atypical mycobacteria from pasteurized milk. *Am Rev Respir Dis* 1968; 98: 1052-4.
11. Durmaz R (ed). Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde sorunlar ve standardizasyon, s: 45-6. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2001, 2. Baskı. Kozan Ofset, Ankara.
12. Shinnick T. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 1987; 169: 1080-8.
13. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 175 -8.
14. Ergin MA, Kocagöz T, Us D, Günalp A. Evaluation of 120 Mycobacterial strains isolated from clinical specimens to the species level by polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 657-62.
15. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 2492-6.
16. Chang CT, Wang LY, Liao CY, Huang SP. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 3159-61.
17. Narang R, Narang P, Mendiratta DK. Isolation and identification of nontuberculosis mycobacteria from water and soil in central India. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 247-50.
18. Akbal H. Çevre örnekleri ve klinik materyallerden üretilen mikobakterilerin tiplendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Yüksek Lisans Tezi, 1998.
19. Kubica GP, Beam RE, Palmer JW. A method for the isolation of unclassified acid-fast bacilli from soil and water. *Am Rev Respir Dis* 1963; 88: 718-20.



20. Donoghue HD, Overend E, Stanford JL. A longitudinal study of environmental mycobacteria on a farm in south-west England. *J Appl Microbiol* 1997; 82: 57-67.
21. Katila ML, Iivanainen E, Torkko P, Kauppinen J, Martikainen P, Väänänen P. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria in the Finish environment. *Scand J Infect Dis Suppl* 1995; 98: 9-11.
22. Leite CQ, Anno IS, Leite SR, Roxo E, Morlock GP, Cooksey RC. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 319-23.
23. Jordao Junior CM, Lopes FC, David S, Farache Filho A, Leite CQ. Detection of nontuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. *Food Microbiol* 2009; 26: 658-61.
24. Konuk M, Korcan E, Dülgerbaki S, Altındış M. Isolation and identification of mycobacteria from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. *Intern J Food Microbiol* 2007; 115: 343-7.
25. Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29: 911-34.