

Keratit olgularında mikrobiyal etkenlerle birlikte mikobakteri varlığının araştırılması

Investigation of the presence of mycobacteria along with microbial agents in cases of keratitis

Ali ÜÇKAYABAŞI¹ (ID), Tülay KANDEMİR¹ (ID), Toğrul NAĞIYEV¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) ayırıcı tanısındaki çeşitli sorunlar sebebiyle klinisyenler bu fırsatçı bakterileri göz ardı edebilmektedirler. Pulmoner tüberküloz şüpheli hastalarda mikobakteri identifikasyonu ve ilaç direnç tayininde olduğu gibi mikobakteriyel keratit gibi akciğer dışı mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında da son yıllarda başarıyla uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli moleküler yöntemlerde DNA genellikle bakteri kültüründen ekstrakte edilmektedir. Kültürde özellikle mikobakterilerde yaşanan zorluklar göz önüne alındığında, yalnızca kültürden değil, doğrudan klinik örneklerden de DNA ekstraksiyonunun hızlı ve doğru tanı protokollerinin geliştirilmesine ışık tutacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada keratitli hastaların korneal kazıntı örneklerinde mikrobiyal etkenlerle birlikte mikobakteri varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Keratit tanısı alan 43 hastadan bakteriyolojik ve mikolojik incelemeler için korneal

ABSTRACT

Objective: Because of various problems in the differential diagnosis of non-tuberculous mycobacteria (NTM), clinicians may ignore these opportunistic bacteria. DNA is usually extracted from the bacterial culture in polymerase chain reaction (PCR)-based molecular methods, which have been successfully applied in recent years in the diagnosis of extrapulmonary mycobacterial infections such as mycobacterial keratitis, as well as in mycobacterial identification and drug resistance determination in patients with suspected pulmonary tuberculosis. Considering the difficulties experienced in culture, especially in mycobacteria, it is thought that DNA extraction not only from culture but also directly from clinical samples will shed light on the development of rapid and accurate diagnostic protocols. In this study, it was aimed to investigate the presence of mycobacteria along with microbial agents in corneal scraping samples of patients with keratitis.

Methods: Corneal scraping samples were collected for bacteriological and mycological examinations from

* Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2016-6813 numaralı proje ile desteklenmiş olup Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Bu çalışmaya ait veriler Uluslararası Sağlık ve Çevre Kongresi (USCEK)'nde (23-25 Ekim 2017, Adana) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Adana



İletişim / Corresponding Author : Ali ÜÇKAYABAŞI
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sarıçam / Adana - Türkiye
E-posta / E-mail : ckybsiali@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 30.06.2022
Kabul Tarihi / Accepted : 01.08.2022

DOI ID : 10.55051/TurkHijyen.2022.17003

Üçkayabaşı A, Kandemir T, Nağıyev T. Keratit olgularında mikrobiyal etkenlerle birlikte mikobakteri varlığının araştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(3): 509 - 522

kazıntı örnekleri alınmıştır. Rutin bakteri ve mantar kültürlerine ek olarak yapılan mikobakteriyolojik incelemede örnekler Löwenstein-Jensen (LJ) ve Mycobacterium growth indicator tube (MGIT) 960 likit sistemde inoküle edilmiş ve direkt preparasyonlar Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak mikroskopik olarak incelenmiştir. Mikobakteri varlığı aynı zamanda doğrudan korneal kazıntı örneklerinden DNA ekstraksiyonu sonrasında hsp65 gen bölgesini hedef alan spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi ile de araştırılmıştır.

Bulgular: Gerek fenotipik gerekse moleküler yöntemlerle yapılan mikobakteriyolojik inceleme sonucunda korneal kazıntı örneklerinin hiçbirinde mikobakteri kolonizasyonu tespit edilememiştir. Değerlendirilen 43 keratitli hastanın %39,5'inden mikobakteri dışında çeşitli bakteriler izole edildiği, kadınlarda bu oranın %47,1; erkeklerde ise %34,66 olduğu tespit edilmiştir. En sık izole edilen bakteriyel etkenin Staphylococcus epidermidis (%23,3) olduğu, miks kolonizasyon oranının da %16,3 olduğu belirlenmiştir. Bakteriyolojik ve patolojik inceleme sonuçları ile tanı grupları, cinsiyet ve yaş arasında bir ilişki bulunmasa da, keratite eşlik eden ek göz hastalığının daha ileri yaşlarda görülmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.036$).

Sonuç: Çalışmamızda hiç mikobakteri tespit edilemese de, doğrudan korneal kazıntı örneklerinde moleküler bir yöntemle mikobakterilerin araştırıldığı ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Sonuç olarak, daha geniş popülasyonda yapılacak çalışmalarda, gözden kaçan mikobakteri olgularının erken ve doğru teşhisinin hızlı ilaç direnci tespiti ile tedavi stratejilerinin daha akılcı bir şekilde planlanmasına imkan sağlayacağı kanaatine varılmıştır. Özellikle de, keratit olgularının neredeyse tamamının (%95) çoklu ilaç dirençli tüberküloz (MDR TB) ve TDM enfeksiyonları için en önemli tedavi seçenekleri olan florokinolon ve/veya amikasin ile tedavi edilmesi, mikobakterilerin kolonizasyonunun ve bulaştırıcılığının geçici olarak baskılanmış olabileceğini, ancak yakın gelecekte bu ilaçlara dirençli mikobakterilerin

43 patients diagnosed with keratitis at Balcalı Hospital of Çukurova University Faculty of Medicine between September 2016 and April 2017. In addition to routine bacterial and fungal cultures, in mycobacteriological examination, samples were inoculated in Löwenstein-Jensen (LJ) and Mycobacterium growth indicator tube (MGIT) 960 liquid system, and direct preparations were stained with the Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) method and examined microscopically. The existence of mycobacteria was also investigated by polymerase chain reaction (PCR) testing using specific primers targeting the hsp65 gene region after DNA extraction directly from corneal scraping samples.

Results: No mycobacterial colonization could be detected in any of the corneal scraping samples as a result of mycobacteriological examination performed by both phenotypic and molecular methods. It was determined that various bacteria, except mycobacteria, were isolated from 39.5% of the 43 patients with keratitis evaluated, this rate was 47.1% in women and 34.66% in men. It was determined that the most frequently isolated bacterial agent was Staphylococcus epidermidis (23.3%), and the mixed colonization rate was 16.3%. Although there was no relationship between the results of bacteriological and pathological examinations and the diagnosis groups, gender, and age, it was statistically significant that additional eye disease accompanying keratitis was seen at older ages ($p=0.036$).

Conclusion: Although no mycobacteria were detected in our study, it is the first study in which mycobacteria were investigated by a molecular method in direct corneal scraping samples. It was concluded that early and accurate diagnosis of overlooked mycobacterial cases would enable rapid drug resistance detection and treatment strategies to be planned more rationally, in the light of studies to be conducted with larger populations. In particular, the treatment of almost all keratitis cases (95%) with fluoroquinolones and/or amikacin, which are the most important therapeutic options for multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and TDM infections, suggests that mycobacterial colonization and infectivity may be

sebepler olduğu enfeksiyonlara maruz kalabileceğimizi düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bakteri identifikasyonu, hsp65, keratit, korneal kazıntı örnekleri, mikobakteri, mikrobiyal etken, PCR

temporarily suppressed. However, this may result in our exposure to infections caused by mycobacteria resistant to these drugs in the near future.

Key Words: Bacterial identification, corneal scraping samples, hsp65, keratitis, microbial agent, mycobacterium, PCR

GİRİŞ

Korneanın epitel ve stroma katmanlarında infiltrasyonla karakterize bir enfeksiyon olan mikrobiyal keratitin etiyolojisinde bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi mikroorganizmalar rol oynamaktadır (1,2). Bu enfeksiyonların ayırıcı tanısında ciddi zorluklarla karşılaşmakta, bunda mikobakterilerin, özellikle de tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) önemi giderek artmaktadır (3-5). Özellikle bağışıklığı zayıflamış bireylerde kontaminasyon ya da kolonizasyon sonucunda hastalık oluşturan mikobakteriler kornea, iris, lens, koroid, retina ve optik sinir gibi göz ve ilişkili dokularda da tanı ve tedavisi güç olan enfeksiyonlara neden olmaktadır. Son yıllarda TDM'lerin sorumlu tutulduğu oküler enfeksiyonlarda artış görülmektedir (6-8). TDM'ler hava, toprak ve su gibi doğal çevrede ve yiyeceklerde yaygın olarak bulunabilen fırsatçı patojenlerdir (3-6). Mikobakteriyel keratitler sıklıkla göz travması ya da cerrahi girişim sonrasında ortaya çıkmaktadır (2,7,8). Artan bir şekilde uygulanmakta olan lazer refraktif cerrahi ve keratoplasti gibi uygulamalara bağlı olarak 1990'lı yıllardan itibaren TDM keratiti daha yaygın bir şekilde rapor edilmiştir (9-11).

Bu mikroorganizmaların yavaş üremesi ve virülansının zayıf olması, bu yüzden enfeksiyonun nadir olarak gelişmesi, oluşan klinik tablonun diğer az virülen bakteri ve mantarların yol açtığı

enfeksiyonlarla benzerlik göstermesi ve organizmanın rutin tanıda kullanılan boyalarla az görülmesi gibi çeşitli zorluklardan dolayı TDM'lerin ayırıcı tanısında problem yaşanmaktadır. Kültürde izolasyon zorlukları ile birlikte moleküler tanıdaki yetersiz optimizasyona bağlı olarak mikobakteriyel keratit insidansı bütün dünyada düşük bulunmakta, böylece rutin tanıda mikobakterilerin göz ardı edilmesiyle uygulanan tedavi stratejileri başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (11-13). Son yıllarda PCR temelli moleküler yöntemlerle, akciğer tüberkülozu şüphesi olan hastalara ait balgam örneklerinden doğrudan izole edilen DNA kullanılarak yapılan mikobakteriyel identifikasyon ve ilaç direncinin tespiti ile erken tanı ve akılcı tedavi için önemli adımlar atılmaktadır. Fakat, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde oküler örneklerde PCR temelli moleküler yöntemlerin rutin tanıda uygulanması henüz önerilememektedir. Bu sebeple, büyük merkezlerden, daha sonra yalnızca *Mycobacterium tuberculosis* için değil, aynı zamanda saptanması zor diğer mikroorganizmalar için de bu moleküler tekniklerle doğrulama çalışmaları için kullanılacak fazla oküler örnekleri dondurmaları istenmektedir (14). Bununla birlikte yapılan az sayıda araştırma sonucunda, ekstrapulmoner mikobakteriyel enfeksiyonların tanısında da konvansiyonel kültür yöntemlerinin yanında, yalnızca kültürden değil doğrudan klinik örneklerden de DNA ekstrakte edilerek yapılacak moleküler testlerin daha hızlı ve doğru tanı

protokollerine ışık tutacağı düşünülmektedir (5,15-19).

Bütün bunlar göz önüne alınarak, bu çalışmada keratitli hastalardan alınan korneal kazıntı örneklerinde rutin mikrobiyolojik incelemelere ek olarak, konvansiyonel kültür yöntemleri ile birlikte bu kazıntı örneklerinden doğrudan DNA ekstraksiyonu yapılarak PCR yöntemiyle de mikobakteri varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu yönüyle çalışmamız orijinal bir araştırma özelliği taşımaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile (Tarih: 01.04.2016 ve Karar No: 12) gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin toplanması

Çalışmaya Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Göz Hastalıkları Polikliniğine 2016 Eylül - 2017 Nisan tarihleri arasında başvuran ve klinik olarak keratit tanısı konulan toplam 49 hastadan korneal kazıntı örnekleri alınabilen 43 (%87,8) hasta dahil edilmiştir. Son bir haftada mikrobiyal keratit tanısıyla antibakteriyel veya antifungal ilaç ya da topikal veya sistemik steroid kullananlar çalışma dışı bırakılmıştır. Hastalar iki grup halinde araştırılmıştır. Bunlardan yalnızca keratit tanısı alan 33 (%76,7)'ü birinci grubu, 7'si kornea ülseri, 2'si endoftalmi, 1'i de büllöz keratopati olmak üzere ek göz hastalığı bulunan 10 (%23,3)'ü da ikinci grubu oluşturmuştur. Hastaların yaş, cinsiyet, tanı bilgileriyle birlikte rutin patolojik ve parazitolojik inceleme sonuçları Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan alınmıştır. Bunun dışında rutin mikrobiyolojik incelemeye ek olarak mikobakteriyolojik inceleme için de korneal kazıntı örnekleri alınmıştır. Bu örnekler rutin mikrobiyolojik inceleme için 1 ml serum fizyolojik (SF), mikobakteriyolojik inceleme için ise 1 ml modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 Broth içeren mikrosantrifüj tüplerine alınarak en geç iki saat içerisinde Çukurova

Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ulaştırılmıştır.

Rutin mikrobiyolojik incelemeler

Rutin mikrobiyolojik inceleme için gönderilen korneal kazıntı örneklerinde bakteri ve mantar identifikasyonu amacıyla %5 koyun kanlı agar, endo agar, çikolatamsı agar ve sabouraud glikoz agar (SGA) besiyerlerine ekim yapılmış, üreyen kolonilerin morfolojik, boyanma ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Gram (-) negatif bakterilerin identifikasyonu ve doğrulanması için; oksidaz, katalaz, indol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, sitrat testleri ve BBL Crystal Enterik/Fermente Etmeyen (E/NF) Tanımlama (ID) Sistemi (Becton Dickinson, ABD) kullanılmıştır. Gram (+) pozitif bakteriler de katalaz, pirolidonil arilamidaz (PYR), koagülaz testleri, mannitol fermantasyonu, hemolitik aktivite, basitrasin, optokin ve novobiosin duyarlılık testleri ve BBL Crystal Gram-Pozitif Tanımlama (ID) Sistemi (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak identifiye edilmiştir.

Mikobakteriyolojik inceleme

Mikobakteri varlığı hem fenotipik hem de moleküler yöntemlerle doğrudan korneal kazıntı örneklerinde araştırılmıştır. Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar karbol fuksin yöntemi EZN ile boyandıktan sonra ışık mikroskopu ile mikobakteri varlığı araştırılmıştır. Kültür ortamında izolasyon için mikobakteriyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan LJ agar besiyeri ve 7 ml'lik modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 Broth içeren BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistem kullanılmıştır. LJ agar içerisinde 0,3 ml MGIT'a ise 0,5 ml oranında ekim yapılan örnekler daha sonra 6-8 hafta (ortalama 42 gün) boyunca 37°C de inkübe edilmiştir. 42 günün sonunda pozitif sonuç vermeyen örnekler negatif kabul edilmiştir.

Mikobakteri varlığının PCR yöntemi ile araştırılması için bütün korneal kazıntı örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Bunun için etil alkol presipitasyon yöntemi (20) ve MICKLE cihazında

mekanik ekstraksiyon (21) olmak üzere iki farklı protokol uygulanmıştır. Her iki yöntemle elde edilen DNA örnekleri ayrı ayrı test edilmiştir. PCR amplifikasyonu mikobakterilerin hsp65 genine ait 439 bp uzunluğundaki spesifik bölgeyi hedef alan TB11 (5'-CAACGATGGTGTGCCCAT-3') ve TB12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') primerleri kullanılarak Saifi ve arkadaşlarının daha önce yapmış olduğu şekilde gerçekleştirilmiştir (22). Pozitif kontrol olarak anabilim dalımızda daha önce kültürde izole edilerek, DNA dizi analiziyle tür düzeyinde tanımlanmış *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşu kullanılmıştır. Amplifikasyon ürünleri, 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde 120 voltta 1 saat elektroforez uygulandıktan sonra ultraviyole altında görüntülenmiştir.

İstatistiksel analiz

Bulgularımızın istatistiksel analizi "Statistical Package for the Social Sciences IBM SPSS Statistics 22.0" programı ile yapılmıştır. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde, sayısal değişkenler ise ortalama ve standart

sapma olarak verilmiştir. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Pearson Ki-Kare testi, yaş ortalamalarının ikili grup karşılaştırılmalarında ise Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Analizler %95 güven aralığında çalışılmıştır. Bütün analizlerde istatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.

BULGULAR

Korneal kazıntı örnekleri değerlendirilen 43 hastadan yalnız keratit tanılı birinci gruptaki hastaların 14 (%42,4)'ü kadın, 19 (%57,6)'u erkek olup, yaş ortalaması 50,8±21,6, ortancası 51,0 (1-83) olarak bulunmuştur. Ek göz hastalığı bulunan ikinci gruptaki hastaların da 4 (%41,9)'ü kadın, 6 (%58,1)'i erkek erkek olup yaş ortalaması 65,2±24,1, ortancası 74,5 (1-84) olarak bulunmuştur.

Bakteriyolojik inceleme sonucunda 8/18 (%44,4)'i kadın 9/25 (%36,0)'i erkek olmak üzere toplam 17/43 (%39,5) hastaya ait korneal kazıntı örneklerinde başta Gram pozitif koklar olmak üzere bakteri üremiş, en sık %23,3 (10/43) oranı ile *Staphylococcus epidermidis*

Tablo 1. Korneal kazıntı örnekleri değerlendirilen 43 hastanın patolojik ve bakteriyolojik inceleme sonuçları

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Tanı	Patolojik İnceleme Sonucu	Bakteriyolojik İnceleme Sonucu
1	Kadın	57	keratit + kornea ülseri	yoğun nötrofil	-
2	Erkek	42	keratit	mantar hifaları, aktif kronik iltihap	-
3	Erkek	50	keratit	mantar enfeksiyonu uyumlu	-
4	Kadın	84	keratit + kornea ülseri	yoğun nötrofil	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
5	Erkek	73	keratit + kornea ülseri		<i>Staphylococcus aureus</i>
6	Erkek	35	keratit	mantar enfeksiyonu uyumlu	-
7	Kadın	78	keratit + kornea ülseri	akut ülseratif keratit	-
8	Kadın	80	keratit	yoğun nötrofil	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Shewanella algae</i>
9	Kadın	58	keratit + endoftalmi	mantar enfeksiyonu uyumlu	-
10	Erkek	57	keratit	nötrofiller	-
11	Erkek	45	keratit	nötrofiller	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
12	Erkek	81	keratit	nötrofiller	-
13	Kadın	64	keratit	nötrofiller	Difteroid (1 koloni)

Tablo 1 (devamı). Korneal kazıntı örnekleri değerlendirilen 43 hastanın patolojik ve bakteriyolojik inceleme sonuçları

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Tanı	Patolojik İnceleme Sonucu	Bakteriyolojik İnceleme Sonucu
14	Kadın	20	keratit	nadir nötrofil	-
15	Erkek	42	keratit		-
16	Erkek	67	keratit	ezilme artefaktı	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
17	Kadın	17	keratit	nötrofiller	<i>Serratia marcescens</i>
18	Kadın	38	keratit	mantar enfeksiyonu uyumlu	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
19	Erkek	76	keratit + kornea ülseri	nötrofiller	-
20	Kadın	78	keratit	nadir nötrofil	-
21	Erkek	55	keratit	nötrofiller	-
22	Erkek	77	keratit + kornea ülseri	nötrofiller	-
23	Erkek	52	keratit	nötrofiller	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
24	Kadın	14	keratit	yoğun nötrofil	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Rothia mucilaginosa</i>
25	Erkek	79	keratit	reaktif kornea epitel hücreleri	-
26	Erkek	34	keratit	dejenere kornea epiteli	-
27	Erkek	83	keratit	nötrofiller	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , difteroid, <i>Veillonella spp.</i>
28	Erkek	67	keratit	nötrofiller	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
29	Kadın	49	keratit	akut süpüratif enflamasyon	-
30	Kadın	0	keratit	yoğun nötrofil	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i>
31	Erkek	75	keratit	nötrofiller	<i>taphylococcus epidermidis</i> , difteroid
32	Erkek	65	keratit	dejenere kornea epiteli	-
33	Erkek	76	keratit + büllöz keratopati	nötrofiller	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus spp.</i>
34	Kadın	22	keratit	ezilme artefaktı	<i>Serratia marcescens</i>
35	Erkek	0	keratit + endoftalmi	nötrofiller, ezilme artefaktı	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Moraxella group</i>
36	Erkek	28	keratit	yoğun nötrofil	-
37	Erkek	64	keratit	nadir nötrofil	-
38	Kadın	57	keratit	yoğun nötrofil	-
39	Kadın	47	keratit	yoğun nötrofil	-
40	Erkek	43	keratit	nötrofiller	-
41	Kadın	51	keratit	nötrofiller	-
42	Erkek	72	keratit + kornea ülseri	konjonktiva epitelinde skuamöz metaplazi, fokal suprabazal ayrılma	-
43	Kadın	76	keratit	nötrofiller	-

izole edilmiştir. Miks kolonizasyon oranı %16,3 (7/43) olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Parazitolojik inceleme sonucunda iki hastadan *Demodex* spp. izole edilmiştir. Bunlardan birinde başka etken izole edilmemişken, diğerinin bakteri kültüründe *S. epidermidis* izole edilmiş ve patoloji sonucuna göre mantar enfeksiyonu düşünülmüştür. Mikolojik kültür ile hiçbir örnekten mantar izole edilememesine karşılık, patolojik inceleme ile; bakteri kültürü de negatif olan bir hastada mantar hifaları tespit edilmiş, bakteri kültürleri negatif olan üç hasta ile *Demodex* spp. ve *S. epidermidis* izole

edilen bir hastada mantar enfeksiyonu ile uyumlu sonuç alınmıştır (Tablo 1).

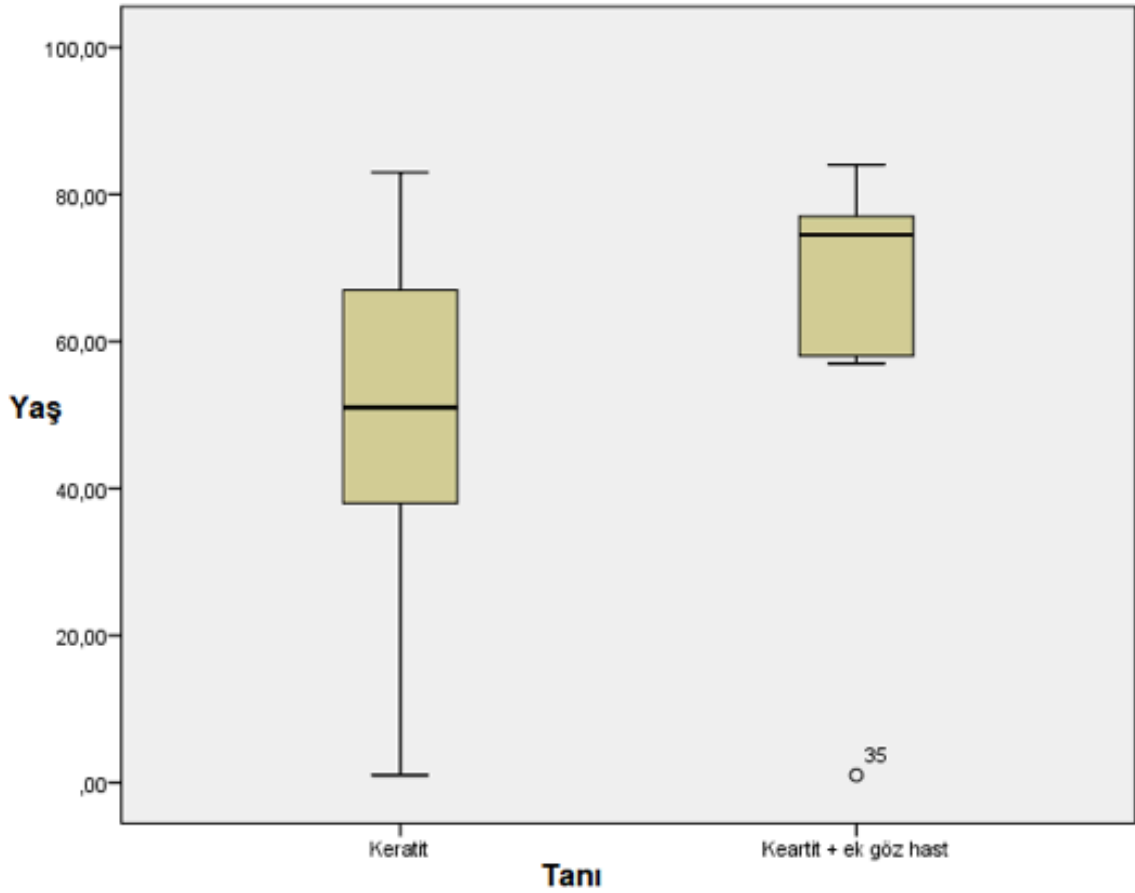
Gerek fenotipik gerekse moleküler yöntemlerle yaptığımız mikobakteriyolojik inceleme sonucunda korneal kazıntı örneklerinin hiçbirinde mikobakteri kolonizasyonu tespit edilememiştir.

Ki kare testine göre, bakteriyolojik ve patolojik inceleme sonuçları tanı grupları ve cinsiyet ile ilişkilendirilememiştir (Tablo 2). Mann-Whitney U testi ile analiz sonucunda ise, yaş ile bakteriyolojik ve patolojik inceleme sonuçları arasında bir ilişki bulunmasa da, keratite eşlik eden ek göz hastalığının

Tablo 2. Bakteriyolojik ve patolojik inceleme sonuçlarının tanı ve cinsiyete göre dağılımı

Bakteriyolojik ve Patolojik İncelemeler		Tanı			Cinsiyet		
		Keratit Sayı (%)	Keartit + Ek Göz Hastalığı Sayı (%)	p Değeri	Erkek Sayı (%)	Kadın Sayı (%)	p Değeri
Mikrobiyal Etken	Bakteri (n=17)	13 (39,4)	4 (40,0)	0,998	9 (36,0)	8 (44,4)	0,725
	Mantar* (n=4)	3 (9,1)	1 (10,0)		3 (12,0)	1 (5,6)	
	Saptanmadı (n=22)	17 (51,5)	5 (50,0)		13 (52,0)	9 (50,0)	
	Toplam (n=43)	33	10		25	18	
Bakteriyel Kültür	Monobakteri (n=10)	8 (24,2)	2 (20,0)	0,918	5 (20,0)	5 (27,8)	0,819
	Polibakteri (n=7)	5 (15,2)	2 (20,0)		4 (16,0)	3 (16,7)	
	Üreme Yok (n=26)	20 (60,6)	6 (60,0)		16 (64,0)	10 (55,5)	
	Toplam (n=43)	33	10		25	18	

*Mantar kültüründe üreme olmasa da, patolojik inceleme sonucuna göre 1 örnekte mantar hifaları görülmüş, 3 örnekte de mantar enfeksiyonu ile uyumlu sonuç bulunmuştur.



Şekil 1. Yaş ortalamasının tanı gruplarına dağılımı

daha ileri yaşlarda görülmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.036$) (Şekil 1).

TARTIŞMA

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) insidansında artma ile birlikte ortaya çıkan en önemli problemlerden biri de TDM enfeksiyonlarındaki artıştır (23,24). Özellikle bağışıklığı zayıflamış kişilerde kontaminasyon veya kolonizasyon sonucunda ciddi oküler enfeksiyonlara yol açabilen

TDM suşları, hem *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) türlerinden hem de diğer bakteriyel, fungal ve viral etkenlerden ayırt edilmesindeki güçlükler nedeniyle yanlış tanı ve tedavilere yol açmaktadırlar (12,23,24). Pulmoner tutulumun olmadığı olgularda, özellikle de keratit gibi oküler enfeksiyonlarda çoğu zaman medikal tedaviye dirençli olan mikobakterilerin identifikasyonu göz ardı edilmektedir. Bu sebeple, olabildiğince hızlı bir şekilde etken mikobakterilerin tespiti ve ilaç direncinin tanımlanarak etkili bir tedaviye

başlanması bu enfeksiyona bağlı kalıcı hasarların ve körlüğün önlenmesi için kritik önem taşımaktadır (7,23,24). Ülkemizde mikobakteri identifikasyonunda ve antitüberküloz ilaç duyarlılığının saptanmasında rutin olarak uygulanan fenotipik yöntemler zor ve zaman alıcıdır. Mikobakteri insidansının düşük bulunduğu gelişmiş ülkelerde identifikasyonda ve direnç tayininde moleküler yöntemler rutin olarak uygulanmakta iken, ülkemizin de dahil olduğu yüksek insidanslı birçok ülkede rutin mikobakteriyel tanı algoritmasında yer almamaktadır (23,24).

Dünyada yapılan çok sayıda çalışmayla birlikte ülkemizde de keratit olguları ile mikobakteriler arasındaki ilişki araştırılmıştır (3,4,6-8,24,25). Ancak doğrudan korneal kazıntı örneklerinden PCR temelli moleküler yöntemlerle mikrobiyal etken tespit edilen az sayıda çalışma olsa da (15,16,19,24) mikobakterilerin gösterildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, Honarvar ve arkadaşlarının 2012 yılında İran'da yaptıkları bir keratit olgu sunumu çalışmasında; transplantasyon yapılan hastanın çıkartılan korneasından alınan biyopsi örneğinden doğrudan DNA ekstrakte edilerek PCR- restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizi yapılmış ve etken izolatın *Mycobacterium aurum* olduğu tespit edilmiştir (5). Ayrıca, Hoffman ve arkadaşlarının 2021 yılında İngiltere'de yaptıkları bir çalışmada; korneal kazıntı örneklerinin kültür sonuçları ile korneal sürüntü örneklerinin PCR sonuçlarını karşılaştırmış, kültürde mikobakteri üretebildikleri tek hastanın PCR sonucu negatif bulunmuştur (18). Bu sonuçlar, aynı şekilde kornea kazıntı örneklerinden de doğrudan DNA ekstrakte edilerek moleküler yöntemlerle erken ve doğru mikobakteriyel etken tespit edilmesinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Güler ve arkadaşları Elazığ'da yaptıkları çalışmada bakteriyel keratit tanısı alan 32 hastayı retrospektif olarak incelemişlerdir. Hastaların %34,3 (11/32) 'ünde çeşitli bakteri türlerinin tespit edildiği ve en yaygın izolatın %64 (7/11) oranı ile streptokok türleri olduğunu belirlemişlerdir (26). Budak ve arkadaşlarının Bursa'da yaptıkları bir çalışmada

keratit tanısı almış 46 hastayı retrospektif olarak incelemiş ve bu hastaların %15'inin bakteriyel, %13'ünün fungal, ve %7'sinin viral etkenlerle enfekte olduğunu belirlemişlerdir (27). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada Yılmaz ve arkadaşları İzmir'de mikrobiyal keratit tanısı alan 620 hastayı retrospektif olarak incelemiş, hastalarının %36,2'sinden etken izole edildiğini, bunların %77,7'sinin bakteri %22,3'ünün mantar olduğunu ve en yaygın izolatın *S. epidermidis* olduğunu belirlemişlerdir (28). Her üç çalışmada mikobakteri tespit edilemediği görülmektedir. Ancak, onların hiçbirinde ayrıca mikobakteriyel inceleme yapılmamıştır.

Manga ve arkadaşları Erzurum'da yaptıkları bir olgu sunumu çalışmasında keratokonjonktivit tanısı almış bir hastayı incelemiş ve tüberküloza ait radyolojik ve laboratuvar bulguları tespit ederek tüberkülozla ilişkilendirmişlerdir (29). Ancak bu çalışmada da mikobakteriyel etken tespit edilememiştir.

Ceyhan ve arkadaşları Ankara'da yaptıkları çalışmada laser in situ keratomileusis (LASIK) operasyonu geçiren bir hastanın korneasından aldıkları örneği kanlı agara ekmiş ve burada üreyen şüpheli kolonileri, mikobakterilerin ürettiği besiyerlerine inoküle etmişlerdir. Kültürde izole edilen mikobakteri kolonilerinden DNA ekstrakte ederek, INNO-LIPA yöntemi ile etken mikroorganizmanın *Mycobacterium chelonae* olduğunu tespit etmişlerdir (8). Bu çalışmada da görüldüğü üzere korneal kazıntı örneklerinden doğrudan mikobakteriyel inceleme yapılmamıştır.

Sarah ve arkadaşları 2016 yılında Fas'ta yaptıkları çalışmada gözlerinde tüberküloz bulguları bulunan iki farklı hastayı incelemişlerdir. Hastalara klinik, dermatolojik, histolojik ve histopatolojik incelemeler sonucunda tanı konulmuş ve antitüberküloz tedavisi başlanmıştır (6). Bu çalışmada mikobakteriyel etken tespit edilememiştir.

Kheir ve arkadaşları tarafından 2015 yılında Lübnan'da yapılan retrospektif bir çalışmada oküler enfeksiyonlarda etken ajan olarak tespit edilen 174 TDM şüphesinin etiyojisi, mikrobiyolojisi, risk faktörleri, teşhisi, klinik durumları ve tedavisi

üzerine yoğunlaşmıştır (3). Amerika’da 2004 yılında retrospektif olarak yapılan başka bir çalışmada ise Abshire ve arkadaşları 1966 ile 2003 yılları arasında mikobakteriyel kökenli keratit hastalarının %90’ının inhibe olduğu minimal inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerlerini hesaplamış ve karşılaştırmışlardır (30). Görüldüğü gibi, bu çalışmalarda PCR yöntemi ile mikobakteri varlığı araştırılmamıştır.

Sampaiao ve arkadaşları 2006 yılında Brezilya’da yaptıkları çalışmada cerrahi operasyon yapılan 36 hastayı retrospektif olarak incelemişlerdir. Enfeksiyöz keratit bulgusu olan beş hastanın korneal kazıntı örneklerinde fenotipik testlere ek olarak, kültürde izole edilen kolonilerde çeşitli bölgelerin dizi analizi ve internal transcribed spacer (ITS) metodu kullanarak *Mycobacterium immunogenum* varyantı tespit etmişlerdir (31). Chu ve arkadaşlarının 2015 yılında retrospektif olarak Tayvan’da yapmış olduğu çalışmada oküler enfeksiyonlarda kültürde üreyen mikobakteri kolonilerinden DNA ekstrakte ederek *secA*, *hsp65* ve *rpoB* gen bölgeleri için multilokus sekans yöntemini kullanmışlar ve TDM izolatlarını tanımlamışlardır (4). Ko ve arkadaşları 2017 yılında Kore’de yaptıkları olgu sunumu çalışmasında, hastadan alınan korneal kazıntı örneğinde tüberküloz dışı mikobakteri tespit etmişler ve yapılan *16S rRNA* dizi analizinde etkenin *Mycobacterium intracellulare* olduğunu göstermişlerdir (9). Silva ve arkadaşları 2019 yılında Brezilya’da yaptıkları çalışmada hastadan aldıkları korneal kazıntı örneğini Loweinstein Jensen besiyerine ekmişler ve üreyen kolonilerden hazırlanan preparatları EZN ile boyayıp mikroskop altında mikobakteri tespit etmişlerdir. Daha sonra hsp-RFLP tekniği ile etkenin *Mycobacterium abscessus* subsp. bolletii olduğunu göstermişlerdir (10). Bostan ve arkadaşları 2019 yılında Kanada’da yaptıkları başka bir olgu sunumu çalışmasında hastadan aldıkları korneal kazıntı örneğini Loweinstein Jensen besiyerine ekmişler ve üreme gözlemlemişlerdir. Yapılan dizi analizinde etkenin *Mycobacterium abscessus* olduğunu tespit etmişler ve hastayı topikal linezolid ile

tedavi etmişlerdir (11). Bu çalışmalarda kültürde izole edilen kolonilerden DNA ekstrakte edilerek PCR uygulanmışken, bizim çalışmamızda DNA ekstraksiyonu doğrudan kornea kazıntı örneğinden yapılmıştır.

Gusmao ve arkadaşları Brezilya’da yaptıkları olgu sunumu çalışmasında inceledikleri hastanın korneal kazıntı örneğinden izole ettikleri kolonilerden DNA ekstrakte ederek PCR-restriksiyon endonükleaz anaziliyle *M. abscessus* tanımlamışlardır. Ancak 6 ay antitüberküloz tedavi aldıktan sonra da hastanın kornea kazıntı örneğinden kültürde tekrar *M. abscessus* üremiştir. Bu kolonilerden de DNA ekstrakte edilerek rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD) ve enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR yöntemleri kullanılmış ve önceki izolatla klonal kökenlerinin aynı olduğu gösterilmiştir (7). Bu çalışma da kornea kazıntı örneklerinden kültür ortamında mikobakteri izole edilebildiğini ve bu izolatların PCR temelli moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanabileceğini ve önemini vurgulamaktadır. Ancak doğrudan kornea örneklerinden DNA ekstrakte edilerek PCR yöntemi uygulanmamıştır.

Zhao ve arkadaşları klinik olarak şüphelenilen enfeksiyöz keratit veya kornea ülseri olan 67 hastadan alınan 80 kornea kazıntı örneğinde direkt PCR yöntemi ile bakteri, mantar ve Herpes simpleks virüs varlığını araştırmış, örneklerden 66 (%82,5)’sında enfeksiyöz etken tespit edildiğini, bunlardan 8 (%10)’inin bakteri olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların direkt PCR yöntemini DNA ekstraksiyonu yapmadan özel polimeraz kullanarak kornea kazıntı örneklerine doğrudan amplifikasyon ile uygulamış ne tür bakteri tespit edildiğini incelememişlerdir (15). Başka bir çalışmada Kim ve arkadaşları 2008 yılında Amerika’da mikrobiyal keratitli hastalarda fungal ve bakteriyel patojenlerin tespiti ve tanımlanması için kültür ile PCR yöntemini karşılaştırmışlardır. 108 hastadan alınan 96 kornea kazıntı örneklerinden DNA ekstraktı ile yapılan PCR sonucunda 58 (%60,4)’i mantar 36 (%37,5)’sı bakteri olmak üzere toplam 94 patojen

tespit edilmiştir (16). Abu Eleinen ve arkadaşlarının 2012 yılında Mısır'da yaptıkları çalışma sonucunda da benzer sonuçlar alınmıştır (19). Bu üç çalışma sonucunda; her ne kadar mikobakteri tespit edilmese de, doğrudan kornea kazıntı örneklerinden DNA ekstraksiyonu yaparak ya da yapmaksızın PCR ile bakteri tespitinin mümkün olduğu gösterilmiştir.

Keratit olgularında mikobakteri varlığının hem fenotipik hem de moleküler yöntemlerle doğrudan korneal kazıntı örneklerinde incelendiği ilk çalışma özelliğini taşıyan araştırmamız sonucunda korneal kazıntı örneklerinden kültürde mikobakteri izole edilemediği gibi PCR yöntemi ile de pozitif sonuç alınamamıştır. Uyguladığımız yöntemlerin tüberküloz şüpheli hastalardan alınan balgam gibi klinik örneklerle çalışıldığı zaman çok güvenilir, duyarlı ve özgül oldukları bilinmektedir (2,6,7,11,24). Ancak bizim amacımız keratitli hastalardan alınan korneal kazıntı örneklerinden mikobakteri izole etmek ve/veya mikobakteriyel DNA kanıtı tespit edebilmektir. Tarama amaçlı doğrudan korneal kazıntı örneklerinden PCR yöntemi ile mikobakterilerin araştırıldığı bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızı kısıtlayan en önemli faktör mikobakteriyel keratitli hastalardan alınan korneal kazıntı örneklerinin pozitif kontrol olarak kullanılamamasıdır. Ne yazık ki, bölgemizde şimdiye kadar rapor edilmeyen ve ülkemizde olduğu

gibi dünyada da düşük insidansa sahip olduğu bildirilen mikobakteriyel keratitli hasta bulunsa bile, pozitif kontrol olarak kullanılacak kadar korneal kazıntı örneği alınması mümkün olmamaktadır. Bunun yerine referans suş olarak kültürde izole edilerek DNA dizi analiziyle tür düzeyinde tanımlanabilen *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşu kullanılmıştır.

Araştırmamız sonucunda hiç mikobakteri tespit edilemese de, doğrudan korneal kazıntı örneklerinden DNA ekstrakte edilerek moleküler bir yöntemle mikobakterilerin araştırıldığı ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızda mikobakteri tespit edilememesinin sebepleri olarak bölgemizde mikobakteriyel keratit insidansının gerçekten de çok düşük olması veya örnek almadaki kısıtlamalar sebebiyle de az sayıda hasta ile çalışılmış olması gösterilebilir. Ayrıca, mikobakteri tedavisinde önemli seçenek olan florokinolonlar ve aminoglikozidlerin yoğun olarak keratit gibi göz enfeksiyonlarında topikal kullanımının da gözardı edilmemesi gerekmektedir. Çünkü bu ilaçlar mikobakterileri baskılayabildiği gibi, ileride daha ciddi direnç kazanmış mikobakteriyel keratit olguları ile karşılaşabileceğimizin sinyalini vermektedir. Daha geniş popülasyonlarla yapılacak insidans çalışmalarının bizim çalışmamızın önemini daha da vurgulayacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

* Çalışmamızda değerlendirdiğimiz korneal kazıntı örneklerinin ve hasta verilerinin titizlikle toplanmasında emeği geçen Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Meltem YAĞMUR, Prof. Dr. Elif ERDEM ve Dr. Öğr. Üyesi İbrahim İnan HARBİYELİ'ye, bulgularımızın istatistiksel analizini yapan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı değerli öğretim üyesi Doç. Dr. Yaşar SERTDEMİR'e, ayrıca laboratuvar çalışmalarımızda yardımlarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a ve Dr. Öğr. Üyesi Mediha Begüm KAYAR'a teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 01.04.2016 ve Karar No: 12).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Hazırolan G, Kemer ÖE, Özek D, Aksoy A, Aksu N. Vorikonazol ile tedavi edilen bir *Aspergillus flavus* kompleks keratit olgusu. Turk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(4): 389-94. doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.81905.
2. Szczotka-Flynn LB, Shovlin JP, Schnider CM, Caffery BE, Alfonso EC, Carnt NA, et al. American academy of optometry microbial keratitis think tank. Optom Vis Sci, 2021; 98(3): 182-98. doi: 10.1097/OPX.0000000000001664.
3. Kheir WJ, Sheheitli H, Fattah MA, Hamam RO. Nontuberculous mycobacterial ocular infections: a systematic review of the literature. Biomed Res Int, 2015; 164989. doi: 10.1155/2015/164989.
4. Chu HS, Chang SC, Shen EP, Hu FR. Nontuberculous mycobacterial ocular infections comparing the clinical and microbiological characteristics between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense*. Plos One, 2015; 10(1): e0116236. doi: 10.1371/journal.pone.0116236.
5. Honarvara B, Movahedan H, Mahmoodi M, Sheikholeslami FM, Farnia P. *Mycobacterium aurum* keratitis: an unusual etiology of a sight-threatening infection. Braz J Infect Dis, 2012; 16(2): 204-8. doi: 10.1590/S1413-86702012000200019.
6. Sarah B, Batoul MS, Ibtissam H, Ouafa H, Said A, Abdeljalil M. Corneal manifestations of tuberculosis: about 2 cases. Am J Med Case Rep, 2016; 4(5): 160-4. doi: 10.12691/ajmcr-4-5-4.
7. Gusmao FA, Alveranga L, Barbosa L, Sampaio J, Leao SC, Hofling AL, et al. Deep stromal mycobacterial keratitis: viable bacteria after six months of treatment: case report and literature review. Arq Bras Oftalmol, 2005; 68(4): 551-3. doi: 10.1590/s0004-27492005000400024.
8. Ceyhan İ, Tarhan G, Cesur S, Gümüslü F. *Mycobacterium chelonae* keratitis following lasik in situ keratomileusis (LASIK) specifically identified by INNO-LIPA method. Turk J Med Sci, 2005; 35: 273-7.

9. Ko J, Kim SK, Yong DE, Kim T, Kim EK. Delayed onset *Mycobacterium intracellulare* keratitis after laser in situ keratomileusis. *Medicine*, 2017; 96(51): e9356. doi: 10.1097/MD.0000000000009356.
10. Silva SC, Almeida IN, Ribeiro WC, Miranda SS, Rocha ACH. *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* keratitis: rare case reported in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 2020; 62: e6. doi: 10.1590/S1678-9946202062006.
11. Bostan C, Slim E, Choremis J, Boutin T, Brunette I, Mabon M, et al. Successful management of severe post-LASIK *Mycobacterium abscessus* keratitis with topical amikacin and linezolid, flap ablation, and topical corticosteroids. *J Cataract Refract Surg*, 2019; 45: 1032-5. doi: 10.1016/j.jcrs.2019.03.001.
12. Egrilmez S, Yildirim-Theveny Ş. Treatment-resistant bacterial keratitis: challenges and solutions. *Clin Ophthalmol*, 2020; 14: 287-97. doi: 10.2147/OPHT.S181997.
13. Frueh BE, Dubuis O, Imesch P, Bohnke M, Bodmer T. *Mycobacterium szulgai* keratitis. *Arch Ophthalmol*, 2000; 118(8): 1123-4. doi:10.1001/archophth.118.8.1123.
14. Leal Jr SM, Rodino KG, Fowler WC, Gilligan PH. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: diagnosis of ocular infections. *Clin Microbiol Rev*, 2021; 34(3): e0007019. doi: 10.1128/CMR.00070-19.
15. Zhao G, Zhai H, Yuan Q, Sun S, Liu T, Xie L. Rapid and sensitive diagnosis of fungal keratitis with direct PCR without template DNA extraction. *Clin Microbiol Infect*, 2014; 20(10): 776-82. doi: 10.1111/1469-0691.12571.
16. Kim E, Chidambaram JD, Srinivasan M, Lalitha P, Wee D, Lietman TM, et al. Prospective comparison of microbial culture and polymerase chain reaction in the diagnosis of corneal ulcer. *Am J Ophthalmol*, 2008; 146(5): 714-23. doi: 10.1016/j.ajo.2008.06.009.
17. Tuft S, Somerville TF, Li JPO, Neal T, De S, Horsburgh MJ, et al. Bacterial keratitis: identifying the areas of clinical uncertainty. *Prog Retin Eye Res*, 2021; 101031. doi: 10.1016/j.preteyeres.2021.101031.
18. Hoffman JJ, Dart JKG, De SK, Carnt N, Cleary G, Hau S. Comparison of culture, confocal microscopy and PCR in routine hospital use for microbial keratitis diagnosis. *Eye*, 2021. doi.org/10.1038/s41433-021-01812-7.
19. Abu Eleinen KG, Mohalhal AA, Elmekawy HE, Abdalbaki AM, Sherif AM, El-Sherif RH, et al. Polymerase chain reaction-guided diagnosis of infective keratitis - a hospital based study. *Curr Eye Res*, 2012; 37(11): 1005-11. doi: 10.3109/02713683.2012.698357.
20. Oda Y, Sadakane K, Yoshikawa Y, Imanaka T, Takiguchi K, Hayashi M, et al. Highly concentrated ethanol solutions: good solvents for DNA as revealed by single-molecule observation. *ChemPhysChem*, 2016; 17: 471-3. doi: 10.1002/cphc.201500988.
21. Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, Brim SE, Sikes D, Mazurek GH, et al. Phenotypic characterization of pncA mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; 44(9): 2291-5. doi: 10.1128/AAC.44.9.2291-2295.2000.
22. Saifi M, Jabbarzadeh E, Bahrmand AR, Karimi A, Pourazar S, Fateh A, et al. HSP65-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. *Clin Microbiol Infect*, 2013; 19(8): 723-8. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.04005.x.
23. Lange C, Abubakar I, Alffenaar JWC, Bothamley G, Caminero JA, Carvalho ACC, et al. Management of patients with multidrugresistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J*, 2014; 44(1): 23-63. doi: 10.1183/09031936.00188313.
24. Ong HS, Sharma N, Phee LM, Mehta JS. Atypical microbial keratitis. *The Ocular Surface*, 2021; doi: 10.1016/j.jtos.2021.11.001.

25. Nascimento H, Viana-Niero C, Nogueira CL, Martins Bispo PJ, Pinto F, de Paula Pereira Uzam C, et al. Identification of the infection source of an outbreak of *Mycobacterium chelonae* keratitis after laser in situ keratomileusis. *Cornea*, 2018; 37(1): 116-22. doi: 10.1097/ico.0000000000001423.
26. Güler M, Kurt J, Evren Ö, Çeliker Ü. Yöremizdeki bakteriyel keratitlerin klinik ve mikrobiyolojik özellikleri. *Fırat Tıp Dergisi*, 2008; 13(4): 235-8.
27. Akova-Budak B, Baykara M, Türüdü S, Yusupov M, Çevik G, Özmen AT, et al. Kliniğimize yatırılarak tedavi edilen keratit olgularının analizi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2011; 37(3): 155-7.
28. Yılmaz S, Öztürk I, Türe M, Maden A. Mikrobiyal keratit tedavisinde 16 yıl. *T Klinikleri J Ophthalmol*, 2008; 17(1): 1-6.
29. Manga G, Çağlar N, Mutluergil N. Fliktenli keratokonjonktivit. *Atatürk Üniversitesi Tıp Bülteni*, 1990; 22(2): 439-42.
30. Abshire R, Cockrum P, Crider J, Schlech B. Topical antibacterial therapy for mycobacterial keratitis: potential for surgical prophylaxis and treatment. *Clin Ther*, 2004; 26(2): 191-6. doi: 10.1016/s0149-2918(04)90018-5.
31. Sampaio JLM, Junior DN, Freitas D, Höfling-Lima AL, Miyashiro K, Alberto FL, Leao SC. An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*. *J Clin Microbiol*, 2006; 44(9): 3201-7. doi: 10.1128/JCM.00656-06.