

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOĞI ve KLİNİK MİKROBİYOLOĞI
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

131781

HASTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN TÜBERKÜLOZ DIŞI
MİKROBAKTERİLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
TANIMLANMASI

T.C. YÜKSEKÖĐRETİM BAKANLIĐI
DOKÜMANTELENEN TEZLER

UZMANLIK TEZİ

131781

Orhan BEDİR
Tbp.Yzb.

ANKARA – 2003

ANKARA - 2003

ÖNSÖZ

“Hasta Örneklerinden İzole Edilen Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin (MOTT) Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması” konulu tez, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 01 MART 2001 gün ve MİK.ABD.:0530-99-01 sayılı emri ile verilmiş ve o tarihten itibaren çalışılmaya başlanmıştır.

Mycobacterium cinsi, 100'e yakın tür içermektedir. Bunlardan bazıları insanlarda enfeksiyona yol açarken bir kısmı potansiyel patojendir. Son yıllarda *Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışındaki mikobakterilerle (MOTT: mycobacteria other than tuberculosis) oluşan enfeksiyonlarda hızlı artışlar görüldüğü bildirilmiştir. Bu mikobakteriler, immün yetmezlikli ve özellikle 1980'lerden sonra epidemisi görülen AIDS'li hastalarda izlendiği gibi, immünitesi normal insanlarda da görülebilmektedir. Ayrıca MOTT'lar nozokomiyal enfeksiyonlara da yol açabilmektedir.

Klinik izolatlardan mikobakterilerin saptanması için Dünya Sağlık Örgütü'nün tavsiye ettiği hızlı kültür sistemi, hastanemizde kullandığımız otomatize, radyometrik BACTEC 460 TB sistemidir. Bu sistemle mikobakteriler *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve MOTT olarak tanımlanabilmektedir. Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması, geleneksel kültür ve biyokimyasal testlerle yapılmaktadır. Bu tanımlama prosedürleri oldukça uzun ve zahmetlidir. Son yıllarda mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması için birçok yeni moleküler yöntemler geliştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, hastanemizde BACTEC 460 TB sistemi ile daha önce tanımlanmış izolatlar ile tez süresince yeni tanımlanan MOTT'ların, “Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis” moleküler yöntemi kullanılarak tür düzeyinde tanımlanması yapılmış ve bu yöntemin rutin kullanıma uygunluğu tartışılmıştır.

Bu tezin hazırlanmasında ve eğitimim süresince yetişmemde büyük katkıları olan en başta Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Levent DOĞANCI olmak üzere, anabilim dalımızdaki diğer tüm değerli öğretim üyelerine, azim ve çalışkanlığıyla beni daima çalışmaya sevk eden tez danışmanım Doç.Dr.Ali ALBAY'a, laboratuvar çalışmalarım ile tez yazımında yardımlarını esirgemeyen Dr. Özgül KISA ve Yrd.Doç.Dr.Orhan BAYLAN'a ve anabilim dalımızın diğer tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmamda malzeme desteğinde bulunan DiO-MED firma yetkililerine ve çalışmamda yardımcı olan Sn. Hülya AYDOĞDU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
I - GİRİŞ	1
II - GENEL BİLGİLER	3
A. Terminoloji	3
B. MOTT'ların Mikrobiyolojik ve Morfolojik Özellikleri	4
C. MOTT'ların Sınıflandırılması	5
D. MOTT'ların Epidemiyolojisi	7
1. AIDS Epidemisinde Önce MOTT İnfeksiyonları	8
2. AIDS Epidemisinde Sonra MOTT İnfeksiyonları	8
E. Nozokomiyal MOTT İnfeksiyonları	9
F. MOTT'ların Ekoloji ve Fizyolojisi	10
G. MOTT'ların Virulansı	11
H. MOTT'ların Genetiği	13
I. MOTT'larda Laboratuvar Tanı	13
1. Geleneksel Tanı Yöntemleri	14
2. Moleküler Tanı Yöntemleri	16
III - GEREÇ ve YÖNTEM	21
IV - BULGULAR	28
V - TARTIŞMA VE SONUÇ	32
VI - ÖZET	40
VII - İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	41
VIII - KAYNAKLAR	42

I - GİRİŞ

Mycobacterium cinsi, 100'e yakın tür içermektedir. Bunlardan bazıları insanlarda infeksiyona yol açarken, bir kısmı potansiyel patojendir. Geri kalan birçok mikobakteri türü ise doğada (toprak, su v.b) saprofit olarak bulunmaktadır. İnsanlarda hastalık oluşturanların çoğunluğu, yavaş üreyen mikobakterilerdir. Bunların başlıcaları, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) ve *M.avium* kompleks (MAK) üyeleri ile *M.kansasii*'dir.

MTK tarafından oluşturulan tüberküloz infeksiyonunun önemi günümüzde tekrar giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 1999 yılı verilerine göre, insanların üçte biri tüberküloz basili ile infekte olup her gün 8000 kişi tüberküloz nedeniyle ölmektedir. Dünyadaki tüm ölümlerin %7'sinden ve gelişmekte olan ülkelerdeki önlenebilir ölümlerin %26'sından sorumlu olan tüberküloz, gelişmiş ülkelerde özellikle AIDS epidemisinden sonra tekrar önem kazanmıştır. DSÖ verilerine göre, 1997 yılında 37 milyon AIDS'li hastanın %50'sinin tüberküloza sahip olduğu saptanmıştır. Asya ve Afrika'da AIDS'li hasta ölümlerinin %40'ından sorumlu olan tüberküloz hastalığı, ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur.

Son yıllarda MTK dışındaki mikobakteriler (MOTT: Mycobacteria other than tuberculosis) ile oluşan infeksiyonların görülme sıklığında hızlı artışların olduğu bildirilmektedir. Bu mikobakteriler, immün yetmezlikli ve özellikle 1980'lerden sonra epidemisi görülen AIDS'li hastalarda izlendiği gibi, immünitesi normal insanlarda da görülebilmektedir. Bu infeksiyonlar, MAK, *M.kansasii*, *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.fortuitum*, *M.malmoense*, *M.xenopi*, *M.marinum*, *M.ulcerans*, *M.scrofulaceum* ve *M.haemophilum*'u içeren çok sayıda MOTT üyesi mikobakteri tarafından oluşturulabilmektedir.

MOTT'lar, aynı zamanda nozokomiyal infeksiyonlara da yol açabilmektedir. Bu mikobakteriler, doğal su kaynakları ve içme su sistemlerinden izole edilmiştir. Aynı şekilde hastanelerin sıcak ve soğuk su sistemlerinde de saptanmış, bunların nozokomiyal salgınlara yol açtığı gösterilmiştir. Nozokomiyal infeksiyona yol açan mikobakterilerin çoğunluğu hızlı üreyen ve birçok dezenfektana dirençli olduklarından, nozokomiyal infeksiyonların kontrolü ve korunma yollarında sorunlar yaşanmaktadır.

Mikobakteri infeksiyonlarının tedavi ve kontrolünde mikrobiyoloji laboratuvarlarına büyük sorumluluklar düşmektedir. Tedavi rejimlerinin belirlenmesi ve epidemiyolojik veriler

açısından, mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde saptanması, tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi son derece önemlidir. Ancak mikobakterilerin izolasyon ve tanımlanmasında kullanılan geleneksel kültür yöntemleri, zaman alıcı ve zahmetli olması nedeniyle uygun tedavinin başlanması gecikmektedir. Son yıllarda mikobakterilerin saptanması ve tanımlanması için hızlı, kolay uygulanan, güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi yönündeki çalışmalar hız kazanmış ve özellikle moleküler biyolojik yöntemler uygulamaya sokulmuştur. Bu yöntemler arasında, DNA dizi analizi, Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis (PRA), Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis (SSCP) ve DNA probları gibi yöntemler bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasındaki ana amacımız; hastanemizin tüberküloz laboratuvarında BACTEC 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD, A.B.D.) sistemi ile izole edilen ve MOTT olarak tanımlanan hasta izolatlarını, PRA yöntemini kullanarak tür düzeyinde tanımlamaktır. Tüm izole edilen mikobakterilerin PRA ile tanımlanmasına gidilmesi, laboratuvarımızdaki MOTT prevalansının oldukça düşük olması nedeniyle maliyet ve iş gücünü büyük ölçüde artıracaktı. Bunu önlemek amacıyla MTK ön tanısı için son derece basit, ucuz ve güvenilir bir yöntem olan kord oluşumunun gösterilmesini de çalışmamıza ekledik.

II - GENEL BİLGİLER

A. TERMİNOLOJİ

MOTT'ların tanımlanmasında kullanılan terminolojide, araştırmacılar arasında farklılıklar vardır. Örneğin “environmental” “anonymous”, “opportunistic”, “atypical”, “nontuberculosis”, “nontuberculous” mikobakteriler, MOTT ile aynı anlamda kullanılmaktadır (41,61). Bunların arasında son yıllarda en çok kullanılanlar, “atypical”, “MOTT” ve “nontuberculous” terimleridir (61). Bu mikobakteri türlerine nasıl bir genel isim verilmesi gerektiği konusunda, geçen uzun yıllara rağmen bir fikir birliği oluşmamıştır. Bu konudaki ilk çabalar 1935 yılında Pinner tarafından başlatılmıştır. Pinner, koloni morfolojisi, hayvanlarda virulans ve besiyerinde pigment oluşturma özelliklerine göre *M.tuberculosis* suşlarına benzemeyen suşlara, “atypical” aside dirençli mikroorganizmalar demiştir (41). Daha sonra toksonomi çalışmaları ilerledikçe “atypical” olarak nitelenen türün aslında, kendi türüne özgü “tipik” özellikler taşıdığı, bu yüzden *M.tuberculosis* türünü referans alıp diğer türler için atipik tanımının doğru olmayacağı görüşü benimsenmiştir (41,42).

Wayne ve Sramek, 1992 yılında *M.tuberculosis* dışında kalan mikobakteriler için iki tanım olan MOTT ve “nontuberculous” mikobakteri (NTM) tanımlarının da tam doğru olmadığını, çünkü *M.tuberculosis* ve diğer mikobakteriler arasındaki farkın tüberküle oluşturma yeteneğinden kaynaklanmadığını, zira atipik mikobakteri türlerinden bazılarının da (*M.avium* ve *M.kansasii*) *M.tuberculosis* gibi akciğerlerde tüberküle oluşturduğunu savunmuşlardır. Tüberküloz dışı mikobakterilerin çok nadiren kişiden kişiye bulaşmaları, doğada serbest olarak yaşayabilmeleri ve fırsatçı hastalık etkeni olmaları sebebiyle “Potansiyel Patojen Çevresel Mikobakteri” (PPÇM) tanımının daha uygun olacağını bildirmişlerdir. Wayne ve Sramek'in bu öneri ve eleştirileri sonrasında, MOTT tanımı biraz değiştirilerek “Mycobacteria other than tubercle bacilli” yerine “Mycobacteria other than *M.tuberculosis* complex” olarak kullanılmaya başlanmıştır (36,41). “Nontuberculosis” tanımlaması da önemli karışıklıklara neden olmaktadır. Tıp literatüründe bu tanım, tüberküloz dışındaki hastalıklar (asbestozis, astım) için de kullanılmaktadır (41,61). Piersimoni, 2000 yılında *Journal of Clinical Microbiology*'de yayınlanan bir yazısında, dergi yayın kurulu olarak kendilerinin *M.tuberculosis* kompleks dışındaki mikobakterilere “mycobacteria other than tuberculosis” tanımının kullanılmasını tercih ettiklerini, son yıllarda yayınlanan literatürlerde ve medline taramalarında da en çok bu terimin tercih edildiğini belirtmiştir (61).

Bu tezin geri kalan bölümlerinde biz de *M.tuberculosis* kompleks dışında kalan mikobakteri türlerinden bahsederken MOTT tanımını kullanacağız.

B. MOTT'LARIN MİKROBİYOLOJİK VE MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Mycobacterium cinsi, *Eubacteria* üst aleminin, *Fermicutes* bölümünün, *Actinomycetes* sınıfının, *Mycobacteria* takımının, *Mycobacteriaceae* ailesine ait olup, bu ailedeki tek cinstir (13,22,42).

Mycobacterium cinsinin tüm üyeleri aerop, hareketsiz, spor oluşturmeyen bakteriler olup hafifçe kıvrık veya düz, 0.2-0.6 µm eninde, 1.0-10.0 µm boyunda, bazen filamentöz formda bazen ise kokobasil şeklinde görülebilen basillerdir. Mikobakteriler her ne kadar gram pozitif hücre duvarına sahip olarak kabul edilirlerse de, lipitten zengin hücre duvarlarına sahip olmaları nedeniyle anilin boyaları hücre duvarına nüfus edemez. Bu nedenle gram boyama ile iyi boyanmaz. Yine aynı nedenle, hücre duvarına nüfus eden boyanın uzaklaştırılması da zordur. Dekolorizasyon işlemi diğer bakterilerde alkolle yapılabilirken, mikobakterilerde asit-alkolle yapılır. Asit kullanımına rağmen, ilk boya hücre duvarında kalır. Yani bu bakteriler almış oldukları boyayı bırakmazlar. Bu özellikleri, "asit dirençlilik" olarak tanımlanır (36,37,42).

MTK üyeleri (*M.tuberculosis*, *M.bovis* ve alt türü *M.bovis* BCG, *M.africanum*, *M.microti* ve 1997 kompleks içine dahil edilen *M.canettii*)'nin bir özelliği (21), trehaloz-6,6'-dimikolat maddesi varlığına bağlı olarak sıvı besiyerlerinde uzun kordonlar oluşturmalarıdır. *M.tuberculosis*'in hücre duvarında bulunan ve mikolik asitlerin trehaloz gibi şekerlere bağlanmasıyla oluşan kord faktörü (KF), bakterinin virulansına katkıda bulunan bir glikolipiddir (3,35,36,80). MTK'ların virulan suşları, karakteristik olarak kültürlerinin yapıldığı besiyerlerinin içeriğine ve kültür koşullarına göre değişiklik göstermekle beraber, sıvı besiyerlerinde sıklıkla basillerin uzun ekseni, kordonun uzun eksenine paralel olacak şekilde dizilirler ve mikroskopik incelemede ip veya demet benzeri, yılankavi toplanmalarına (serpentine cording) neden olan kord oluşturmaktadırlar (3,4,35,50,54,80). *M.tuberculosis*'in avirülan varyantları ve MOTT'lar ise sıvı besiyerlerinde birbirine paralel, yapışmaksızın dağınık halde, merkezi olmayan bir üreme göstermektedirler (3,30,50). Bu nedenle kord oluşturma, MTK'ya ait bir özellik olarak kabul edilir (3,4,30,50,80).

C. MOTT'LARIN SINIFLANDIRILMASI

Ernest Runyon, 1950'lerin sonlarına doğru *M.tuberculosis* ve *M.bovis* dışındaki mikobakterileri, üreme hızları, pigment üretimleri ve koloni morfolojilerini temel alarak 4 gruba ayırmıştır (18,36,42).

1. Fotokromojenler (sadece ışıkta pigment oluşturanlar: Runyon grup I)
2. Skotokromojenler (ışıkta ve karanlıkta pigment oluşturanlar: Runyon grup II)
3. Nonfotokromojenler (pigment oluşturmayanlar: Runyon grup III)
4. Hızlı üreyenler (Runyon grup IV)

Bu sınıflandırma uzun yıllar MOTT'ların sınıflandırılmasında kullanılmıştır. Ancak mikobakteriler hakkındaki genetik ve fenotipik bilgilerin artması sonucunda, eski ve yeni birçok mikobakteri türünün bu sınıflamaya dahil edilmesinde güçlüklerle karşılaşmıştır (42). Örneğin klinik önemi son yıllarda ortaya çıkan *M.kansasii* türü, genellikle fotokromojen olmakla birlikte, bazı suşlarının pigment oluşturmaması, hatta skotokromojen olması, yine bazı *M.avium-intracellulare* suşlarının bariz pigment yapması, Runyon sınıflandırmasına uymamaktadır. Mikobakterilerin sınıflandırmasındaki bu kısıtlamalara rağmen mikrobiyologlar, Runyon sınıflamasını, MOTT'ların biyokimyasal olarak tanımlanmasında kullanmaktadırlar. Her üretilen mikobakteri suşu, önce Runyon'un belirttiği gruptan birine dahil edilir, sonra biyokimyasal deneylerle tanımlamaya gidilir (37,42,79).

Wood ve Washington tarafından klinik önemi olan mikobakteriler, 1987 yılında tekrar sınıflandırılmış; insanlarda potansiyel patojen olan türler, insanlarda nadiren hastalık yapan fırsatçı türler, orta hızlı üreyen türler ile hızlı üreyen türler olarak ayırmışlardır (79).

Amerikan Toraks Derneği 1997 yılında MOTT'ların tanı ve tedavisiyle ilgili kriterleri ayrıntılı bir şekilde açıklamıştır (2). Derneğin insanlardan izole edilen MOTT'larla ilgili sınıflaması (Tablo-I)'de verilmiştir

Tablo I. İnsanlardan izole edilen MOTT'ların sınıflandırılması

Klinik hastalık	Yaygın etiyolojik		Olası etiyolojik
	Tür	Morfoloji	Tür
Akciğer infeksiyonu	1. MAK	Yavaş ürer (>7 g)	1. <i>M.simiae</i>
	2. <i>M.kansasii</i>	Genellikle pigmentsiz	2. <i>M.szulgai</i>
	3. <i>M.abscessus</i>	Pigmentli, EZN' de geniş ve boncuk tanesi	3. <i>M.fortuitum</i>
	4. <i>M.xenopi</i>	Hızlı üreyen (< 7) pigmentsiz	4. <i>M.celatum</i>
	5. <i>M.malmoense</i>	Yavaş ürer; pigmentli	5. <i>M.asiaticum</i>
Lenfadenit	1. MAK	Genellikle pigmentsiz	6. <i>M.shimodi</i>
	2. <i>M.scrofulaceum</i>	Pigmentli	7. <i>M.haemophilum</i>
	3. <i>M.malmoense</i>	Yavaş ürer.	8. <i>M.smegmatis</i>
Cilt infeksiyonu	1. <i>M.marinum</i>	Genellikle pigmentsiz	1. <i>M.fortuitum</i>
	2. <i>M.fortuitum</i>	Pigmentli	2. <i>M.cheloniae</i>
	3. <i>M.cheloniae</i>	Yavaş ürer.	3. <i>M.abscessus</i>
	4. <i>M.abscessus</i>	İzolasyon (28-30 °C) Fotokromojen	4. <i>M.kansasii</i>
	5. <i>M.ulcerans</i>	Pigmentli	5. <i>M.haemophilum</i>
Yaygın infeksiyon	1. MAK	Hızlı üreyen; pigmentsiz	1. MAK
	2. <i>M.kansasii</i>	Yavaş ürer; pigmentli	2. <i>M.kansasii</i>
	3. <i>M.cheloniae</i>	AIDS'li hastalardaki genellikle pigmentli (%80)	3. <i>M.nonchromogenicum</i>
	4. <i>M.haemophilum</i>	Fotokromojen	4. <i>M.smegmatis</i>
		Pigmentsiz	5. <i>M.haemophilum</i>
		Pigmentsiz; üreme için hemin, düşük ısı ve CO ₂	
			1. <i>M.abscessus</i>
			2. <i>M.xenopi</i>
			3. <i>M.genavense</i>
			4. <i>M.simiae</i>
			5. <i>M.conspicuum</i>
			6. <i>M.marinum</i>
			7. <i>M.fortuitum</i>
			8. <i>M.malmoense</i>

EZN: Ehrlich Ziehl Neelsen

D. MOTT'LARIN EPİDEMİYOLOJİSİ

Tüberküloz insidansı düştükçe, MOTT'larla oluşan infeksiyonların tanımlanması artmıştır. Bu mikobakterilerin oluşturduğu hastalıkların tedavisiyle ilgili kapsamlı ilk çalışma, 1979 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışma, MOTT'ların da insanlarda hastalığa neden olabildiğini ortaya koymuştur. Bunu MOTT'ların insan ve hayvanlarda hastalık oluşturduğu ve bu hastalıklarda oynadıkları rolleri açıklayan pek çok çalışma takip etmiştir (18,42).

Denver'de 1979 yılında yapılan uluslararası bir konferansta MOTT'larla ilgili çalışmalar derlenmiş ve bakterilerin epidemiyoloji, patojenite, taksonomi ve moleküler genetiği ile ilgili ilk kanıtlar ortaya konmuştur. Bu çalışmalar MOTT'larla ilgili çalışmaların çıkış noktasını teşkil etmiştir (18).

MOTT ile oluşan hastalıklar daha çok gelişmiş ülkelerde, nadiren gelişmekte olan ülkelerde görülür. Tüberküloz insidansının düşük olduğu Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.) ve Avrupa ülkelerinde MOTT ile oluşan infeksiyonların görülme sıklığı, özellikle AIDS hastalarında yüksektir. AIDS hastalarındaki mikobakteriyel infeksiyonlar genellikle lokalize kalmayıp tüm vücuda yayılmakta ve ayrıca hastalığa neden olan mikobakteri türleri, AIDS hastalarında değişiklik göstermektedir (2,6,18).

MAK ve *M.scrofulaceum*'un doğal yaşam ortamının değişiyor olma olasılığı fikri, servikal lenfadenitli çocuklardan izole edilen MOTT sıklığının ve hayvanlarda infeksiyona yol açan MAK serovarlarının değişiminin gösterilmesiyle desteklenmiştir (18). *M.scrofulaceum*, 1979 yılına kadar çocuklarda servikal lenfadenitin en sık görülen etkeni iken, İngiltere ve A.B.D'de yapılan araştırmalarda son yıllarda en sık görülen etkenin *M.avium* olduğu anlaşılmıştır (6,18). Domuzların tüberkülozlu lenf nodlarından izole edilen *M.avium* serotiplerinde de değişiklik olduğu izlenmektedir. Domuzların tüberküloz lezyonlarından 1973-1982 yılları arasında izole edilen izolatların %74.5'ini *M.avium* serovar 1 ve 2 oluşturmuşken; 1983-1992 yılları arasında bu oran %15.7'ye düşmüş, buna karşılık *M.avium* serovar 4 ve 8 oranı 1973-1982 yılları arasında %10.3'ten 1983-1992 yılları arasında %27.8'e yükselmiştir (16,18).

MAK'a ait türler içme suyu dağıtım sistemlerinden de izole edilebilmektedir. İzole edilen bu mikobakteriler, sağlıklı bireylerden farklı olarak AIDS hastalarının infeksiyonundan sorumlu MAK kaynağını oluşturuyor olabilir (10,58).

Tüberküloz insidansının yüksek olduğu Afrika ve gelişmekte olan ülkelerdeki AIDS hastalarındaki MOTT infeksiyon insidansı düşüktür. Bu hastalarda MOTT infeksiyonlarının

az görülmesi, çevresel mikroorganizma eksikliğinden kaynaklanmamaktadır. Muhtemelen Afrika'daki AIDS hastaları, MOTT'a bağlı infeksiyonlar gelişmeden daha erken evrede, başka nedenlerden kaybedilmektedir (16,18,42). MOTT tanısını koyabilecek, üst düzey laboratuvarların yeterli sayıda olmayışı da bir başka neden olarak gösterilebilir (18).

1. AIDS EPİDEMİSİNDEN ÖNCE MOTT İNFEKSİYONLARI

AIDS'in ortaya çıkmasından önce MOTT'ların oluşturduğu hastalıklar, akciğerler, servikal lenf nodları ve deride, nadiren dissemine formda görülmekteydi. Bulaşmanın suyla temas şeklinde olduğu *M.marinum* ile, cilt infeksiyonuna yol açan *M.scrofulaceum* istisna olmak üzere, MOTT infeksiyonlarında insandan insana geçişinin olmadığı ve AIDS epidemisi öncesinde akciğer infeksiyonlarında etkenin aerosol yolla geçtiği düşünülüyordu (18,42,79).

Akciğer hastalığına daha çok yaşamın altıncı dekatındaki erkeklerde rastlanırdı. Çoğu hastada altta yatan sebepler (pnömokonyoz KOAH v.b) mevcuttu ya da hastalar toza maruz kaldıkları şartlarda çalışıyorlardı (çiftçilik v.b). İnsandan insana geçiş ile ilgili kanıt olmadığından, insanların çevresel kaynaklardan aerosollerle infekte oldukları öngörülmüyordu. MOTT infeksiyonu öyküsü olan hastaların oranlarındaki bölgesel farklılıklar, bu hipotezle uyumluydu. Çevreden kazanılmış MOTT infeksiyonlarının, insanlarda *M.tuberculosis*'e karşı immünite gelişmesinde bir miktar katkıda bulunduğu düşünülüyordu (18,19,36).

Solunum yollarına ait esas mikobakteriyel patojenler, *M.kansasii*, *M.avium* ve *M.intracellulare* türleridir. *M.kansasii* infeksiyonu sıklıkla şehirlerde, *M.avium* ve *M.intracellulare* infeksiyonu ise sıklıkla kırsal kesimlerde görülmektedir (18,36,37,42).

MOTT'lar sadece inhalasyon yoluyla bulaşmamaktadır. Örneğin, *M.scrofulaceum* çocuklarda servikal lenfadenit etkenidir. *M.marinum* ise sıklıkla yüzme havuzları ve balık endüstrisinde çalışan insanların derilerinde görülmektedir (36,37).

2. AIDS EPİDEMİSİNDEN SONRA MOTT İNFEKSİYONLARI

MOTT infeksiyonlarının görüntüsü, tüm dünyada AIDS epidemisiyle birlikte radikal olarak değişmiştir. A.B.D. ve Avrupa ülkelerindeki AIDS'li hastaların %25-50'si MOTT'lar ile infektidir (18,75). AIDS'li hastalarda ilk MOTT infeksiyonlarının bildirilmeye başladığı 1982 yılından sonra, MOTT hastalıklarının insidansında giderek artış olduğu gözlenmiştir (47,56,67).

Toplum sağlığı ve kemoterapotik profilaksi açısından sebep olan ajanın saptanması gereklidir. AIDS hastalarındaki mikobakteriler çoğunlukla *M.tuberculosis* ve MAK

kaynaklıdır (18,36,37,57,66). *M.kansasii*, *M.intracellulare* gibi diğer mikobakteri türleri ile oluşan hastalıkların sıklığı, AIDS epidemisinde önce olduğu gibi sonrasında da aynı seviyede kalmış, ancak *M.avium* türünün AIDS epidemisi ile birlikte sıklığında artış gözlenmiştir (18). AIDS epidemisi ile birlikte, özellikle serovar 4-8 olmak üzere *M.avium* enfeksiyonları iki kat artmıştır (16).

İmmün yetmezlikli veya AIDS hastalarındaki mikobakteriyel enfeksiyonlarda etkenin vücuda giriş yolu ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Bu yüzden AIDS hastalarında etkenin vücuda girişi ve kaynağının daha geniş olarak araştırılması gereği doğmuştur. Ancak, yine de AIDS hastalarında etkenin vücuda inhalasyon, sindirim veya her iki yolla girdiği kabul edilmektedir (18,36,42).

Etkenin saptanmasında klinik özellikler de önemlidir. MAK enfeksiyonları sıklıkla disseminedir ve etken kan ve dışkıdan izole edilebilir. *M.tuberculosis*'li hastalara göre MAK enfeksiyonlu hastalarda sindirim problemleri, anemi, lökopeni, sitomegalovirus enfeksiyonları daha sık gözlenmektedir (18).

MOTT enfeksiyonlarının seyrinde AIDS'in direk bir etkisi mevcuttur. MOTT enfeksiyonları, AIDS epidemisi öncesinde ve bugün halen immunitesi sağlam kimselerde primer olarak akciğerleri tutmakta iken, AIDS ve immün yetmezlikli hastalarda bu enfeksiyonlar sıklıkla dissemine formda gözlenmektedir (16,18,36,37,42). AIDS'liler gibi immunitesi zayıf kişilerle, immunitesi sağlam hastalar arasında mikobakteriyel deri enfeksiyonları arasında da farklılıklar vardır. İmmünitesi sağlam kişilerde deri veya eklem enfeksiyonları genellikle travma (yaralanma veya cerrahi gibi) ya da kortikosteroid enjeksiyonları ile ilişkilirken, AIDS'li hastalardaki deri ve eklem enfeksiyonları travma veya kortikosteroid kullanımı ile ilişkili değildir (18,37,75).

AIDS'li hastalarda MOTT'ların morbidite ve mortaliteye olumsuz etkileri, MOTT'larla ilgili fizyolojik, epidemiyolojik, ekolojik, genetik ve moleküler biyolojik çalışmaların yapılmasını başlatmıştır. Buna ek olarak, MOTT enfeksiyonlarındaki artış bu etkenlerin hızlı bir şekilde tanımlanması ve tedavi edilmeleriyle ilgili yöntemlerin geliştirilmesini de sağlamıştır (18).

E. NOZOKOMİYAL MOTT İNFEKSİYONLARI

Klinik örneklerden MOTT'ların izolasyonu, enfeksiyon, kolonizasyon veya psödoenfeksiyonu gösterir. İnfeksiyon, genellikle hastanede kalınan süre boyunca saptanabilir.

Ancak MOTT'lar gibi virulansı düşük ve yavaş üreyen organizmalar, hastaneden çıktıktan sonra da infeksiyona yol açabilir (51,52). MOTT'ların toprak ve suda yaygın olarak bulunduğu, birçok hayvanda hastalık yaptığı veya kolonize olduğu bilinmektedir (2,10,11,1844). Avrupa ülkelerinde ve A.B.D.'de hastanelerin sıcak ve soğuk su dağıtım sistemlerinde yapılan sürveyans çalışmalarında, *M.xenopi* ve *M.avium* saptanmıştır (18,44,46,52). *M.kansasii* ise sıklıkla soğuk su sistemlerinden izole edilmiştir (52). Yapılan çalışmalarla bu mikobakterilerin hastalarda kolonize olabildikleri, hatta nozokomiyal salgınlara yol açabildikleri gösterilmiştir (18,52). Aynı şekilde hastanelerde kullanılan ekipmanlarda da (endoskoplar, diyaliz ünitelerindeki cihazlar v.b) bu bakteriler bulunabilmektedir. Özellikle hızlı üreyen mikobakteriler, hem daha sık nozokomiyal infeksiyonlara sebep olmakta, hem de dezenfektanlara dirençli olduklarından bu etkenlerin kontrolü ve hastaların korunması zor olmaktadır (52). Nozokomiyal mikobakteriyel infeksiyon etkenleri (Tablo II)'de gösterilmiştir.

Tablo-II Nozokomiyal mikobakteriyel infeksiyon etkenleri

Klinik sınıflama	<i>M. avium</i>	Hızlı üreyenler ^a	<i>M. xenopi</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. gordonae</i>	Diğer MOTT ^b
İmmün yetmezlikli hastalarda yaygın infeksiyonlar	++					+
Solunum yolunda kolonizasyon/infeksiyon	+	+++	+			
Hemodiyalize bağlı infeksiyon		++		+	+	
Cilt veya eklem içi enjeksiyona bağlı infeksiyonlar		++		+		
Damar içi kateter infeksiyonu	+	++				+
Cerrahi infeksiyonlar		+++			+	+

+: nadir ++: orta sıklıkta +++: sıklıkla

^a *M.chelonae*, *M.fortuitum* ve *M.abscessus*

^b *M.smegmatis*, *M. neoaurum*, *M.gastri* ve *M.genavense* için az sayıda yaygın vardır.

F. MOTT'LARIN EKOLOJİ VE FİZYOLOJİSİ

MOTT'ların ekoloji ve fizyolojisi, *M.tuberculosis*'ten oldukça farklıdır. MOTT'ların çoğu (*M.ulcerans*, *M.haemophilum*, *M.genavense* hariç) doğal çevrede (su, toz, toprak, v.s)

yaygın olarak bulunmaktadır ve aynı zamanda tüm dünyada, içme suyu dağıtım şebekelerinden de izole edilmişlerdir (18,44,51,52). MOTT üyelerinin dezenfektanlara dirençli olması nedeniyle, pek çoğu (MAK, *M.scrofulaceum*, *M.fortuitum* ve *M.xenopi*) yaşamlarını içme suyu şebekelerinde sürdürebilirler (10,11,18,44,52). Ayrıca, MOTT'ların hastanelerin su depolama sistemlerinde bulunmaları nozokomiyal infeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu yüzden doğal ve yapay kaynaklar hastalığın bulaşmasında önemli rol oynar (52). (*M.tuberculosis* infeksiyon bulaşlarında ise hastalar ön plandadır.)

MOTT'ların doğal ve yapay çevrelerde yaygın olarak bulunmaları, fizyolojilerinin araştırılmasının önemini ortaya koymuştur. Bu maksatla yapılan çalışmalar sonunda, MOTT'ların jeografik dağılımının ortaya çıkması sağlanmıştır. Bu mikobakteriler, çok geniş aralıktaki sıcaklık, pH, tuz oranı ve oksijen basıncı değerlerinde yaşayabilirler. Mikobakteriyel fizyoloji ve ekoloji bağlantısının spesifik bir örneğini MAK teşkil eder. En iyi pH 5-5.5'da ve mikroaerofilik olarak ürerler. Buna karşılık aynı mikobakteriler, %2'ye kadar tuzluluk oranına sahip sulara da üreyebilmektedirler. MAK'ların sahip olduğu bu özellikleri, A.B.D'nin güneydoğu sahillerinde bataklık alanlarda ve ırmak ağızlarında neden yüksek oranda bulduklarını açıklamaktadır (18,52).

MOTT'ların çevrede yaygın olarak bulunmasının diğer bir nedeni ise, bu bakterilerin ağır metal ve oksijen-anyonlara karşı göreceli olarak dirençli olmalarıdır. MAK veya *M.scrofulaceum*'un bazı izolatları, kadminyum, civa, gümüş ve tellürite dirençlidir. Civa dirençli izolatların 5/7'si, yüksek metal kirliliği olan yerlerde saptanmıştır. Bu fizyolojik özellik de onların ekolojik ve coğrafik dağılımlarını açıklar (18,52,42). MAK'ın metal metabolizması ve ihtiyacı, popülasyonlarını direkt olarak da etkiler. Örneğin doğal sulardaki *M.avium* oranı, sudaki çinko seviyeleriyle direkt ilişkilidir. Hastane su şebekeleri ve içme suyu dağıtım sistemlerinde MAK'ın yer almasının nedeni, muhtemelen çoğu sistemde galvenize (örneğin çinko) boruların kullanılmasından kaynaklanmaktadır (18,52).

G. MOTT'LARIN VİRULANSI

MOTT'lar akciğer, deri, lenf nodu, yumuşak doku, eklem, tendon ve kemik infeksiyonlarına yol açabilir (2,16,18,36,42). *M.kansasii*, *M.haemophilum* veya *M.chelonae* infeksiyonları, subkutan nodül veya abselerle karakterizedir (2,18,42). İmmunitesi sağlam kişilerde gelişen akciğer infeksiyonlarının çoğunda altta yatan bir durum (kronik obstruktif akciğer hastalığı gibi) vardır (2,18,36,42). Yine bu kişilerde oluşan deri, yumuşak doku,

bursa, eklem, tendon ve kemik infeksiyonları, sıklıkla travma ya da cerrahi yaralanmalarla ilişkilidir. *M.chelonae*'nin sebep olduğu dissemine kutanöz infeksiyonlar ise önceden kortikosteroid kullanımı ile bağlantılıdır. AIDS'li veya immun yetmezlik durumu olan hastalarda infeksiyon sıklıkla yayılımcı niteliktedir (18,37). AIDS'li hastalardaki cilt veya yumuşak doku infeksiyonları, immunitesi sağlam hastalardan farklı olarak travmadan bağımsızdır. Hastalığı başlatmak için gerekli olan mikobakteri sayısı, çoğu tür için bilinmemektedir (18).

Son zamanlarda, MOTT'ların virulans faktörlerini belirlemede gelişmeler kaydedilmiştir. Bu amaçla yapılan araştırmaların çoğu, MAK üyeleriyle gerçekleştirilmiştir. Potansiyel virulans faktörleri; koloni tipi, patolojik veziküllerin asidifikasyonunun önlenmesi, fagozom-lizozom birleşmesinin önlenmesi, hücreler etrafında elektron geçirgen bir bölge oluşması, serumda bulunan inhibitör maddelere direnç, infekte konak hücreleri tarafından tümör nekrozis faktör salınımının gecikmesi, intestinal epitel hücreleri içine alınması, makrofajlar için reseptör üretimi ve mikobakterilerin makrofajlar içinde replikasyon yeteneğidir (16,18,36). *M.ulcerans*'ın sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Fenolik glikolipidlerin varlığı ve oksijen radikallerini ya da lenfoproliferatif yanıtları inhibe etmeleri de mikobakterilerin virulans faktörleri olarak öne sürülmüştür (18).

Güney Hindistan'da saptanan izoniazide dirençli *M.tuberculosis* izolatlarının katalaz aktivitesine sahip olmaması ve bunların izoniazide duyarlı izolatlarla oranla daha düşük virulansa sahip olmaları, uzun yıllar mikobakterilerin virulansı ile katalaz aktiviteleri arasında bir ilişkinin olabileceği fikrini uyandırmıştır. *M.kansasii* suşları arasında yüksek katalaz aktivitesine sahip olanların, düşük katalaz aktivitesi sahip olanlara göre daha virulan olduğu bulunmuştur. *M.bovis* suşlarında katalaz aktivitesini kontrol eden *katG* genindeki bir mutasyonla katalaz aktivitelerinin kaybolmasının virulansı azalttığı gösterilmiştir. Bunların aksine katalaz aktivitesinden sorumlu olan *inhA* geninde oluşan mutasyon, virulansı etkilememiştir. Patojen mikobakterilerin oksijen stresine dayanıklılıkları mükemmeldir. Çünkü *M.tuberculosis* ve *M.avium*'un oksijen stres yanıtı için düzenleyici bir geni (*oxyR*) yok iken, saprofit olan *M.smegmatis*'te bu gen vardır (18,36,79).

MOTT'ların virulans genlerinin tanımlanması için yeni yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. mRNA'nın izolasyonu ve 5-fluorourasil ile işaretlenmesi, mikobakteriyel proteinler ile fagositik hücreler arasındaki fagositosis üzerine etkili genlerin tanımlanması, virulan (*M.tuberculosis* H37Rv) ve avirulan (*M.tuberculosis* H37Ra) suşlar arasında

hibridizasyon yapıp virulan genlerin tanımlanması, bu genlerin işlevlerinin anlaşılmasında umut verici gelişmelerdir. Büyüme koşullarının da MOTT'ların virulansını etkilediği gösterilmiştir. Daha çok deri lezyonlarına yol açtığı saptanan *M.marinum*'un hücre kültürlerinde beklendiği gibi 37°C'de değil 33°C ürettiği gözlenmiştir. *M.intracellulare*'nin 45°C'de, *M.fortuitum*'um ise propan varlığında üretilmesi virulansını arttırmıştır (18,52).

H. MOTT'LARIN GENETİĞİ

Bakteriyel kromozom yapısı, çift iplikli çembersel DNA molekülünden oluşmaktadır ve yaklaşık olarak 3×10^6 baz çifti (bp) büyüklüğündedir. Guanin + sitozin (G+C) içeriği %60-70'dir. Moleküler ve rekombinant DNA analizlerine göre birçok mikobakteri türünün genomu, G+C'den zengin kısa dizilerden, insersiyon elemanları ve transpozonlara kadar değişen tekrarlayan DNA elemanları içermektedir. Örneğin, IS6110 olarak adlandırılan insersiyon dizisi, sadece MTK üyelerinde saptanmıştır ve birçok mikobakteri suşu, bu elemanın 1-20 kopyasını taşıyabilir (16,36,37).

MOTT'ların farklılıklarının genetik temellerinin tanımlanmasında bazı ilerlemeler olmuştur. Günümüze kadar olan bilgilerin çoğu MAK üyeleri ve hızlı üreyen mikobakterilerden elde edilmiştir. Bugün, genom ile ilgili bilgiler, ekstrakromozomal DNA ve transpozabl genetik elementlerin (örneğin; transpozonlar) varlığı, mikobakteriyofaj ve konak hücreleri arasındaki etkileşim bilgileri mevcuttur (16,36).

Bir çok rRNA genine sahip bakteri türlerinden farklı olarak (örneğin; *E.coli*'de yedi kopya), mikobakteriler az sayıda rRNA genine sahiptir. *M.tuberculosis*, *M.leprae*, *M.avium*, *M.paratuberculosis*, *M.intracellulare*, *M.simiae* ve *M.marinum* gibi yavaş üreyen mikobakterilerde 16S, 23S ve 5S rRNA geninden sadece tek bir kopya olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, tek kopya içeren *M.chelonae* ve *M.abscessus* hariç, diğer hızlı üreyen mikobakterilerde iki kopya bulunmaktadır. Hücrelerdeki ribozom sayısı ile protein sentezindeki ilişkiden dolayı, az sayıdaki rRNA geninin protein sentezini ve yavaş üreyen mikobakterilerde büyüme oranını sınırlaması, yavaş üreme nedenini açıklayabilir (18).

I. MOTT'LARDA LABORATUVAR TANI

Özellikle çoklu ilaca dirençli tüberküloz olgularının halk sağlığını tehdit ettiği günümüzde, etkin antimikrobiyal tedavinin hemen uygulanabilmesi, AIDS epidemisinden sonra artan MOTT infeksiyonlarının doğru ve güvenilir olarak tanısının konulabilmesi ve

epidemiyolojik verilerin derlenebilmesi için, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, kısa sürede sonuç veren tanı yöntemlerine ihtiyaç vardır. Son yıllarda bu amaçla pek çok hızlı kültür sistemleri ve moleküler yöntemler geliştirilmiştir (47,49,67,70).

1. Geleneksel Tanı Yöntemleri

Epidemiyolojik açıdan değerlendirilebilmesi ve tedavinin yönlendirilebilmesi için tüberküloz tanısında öncelikle hastalık etkeni olan mikobakterilerin klinik örneklerden izole edilmesi gereklidir. Etkenin üretilmesi ve tanımlanması için, şüpheli infeksiyonlardan değişik klinik örnekler alınabilir. Bunların en önemlisi solunum yolu örnekleri olup, idrar, steril vücut sıvıları, doku ve gastrik aspirat örnekleri de izolasyon için kullanılabilir. Kan ve dışkı örnekleri ise, özellikle AIDS'li hastalardaki yaygın infeksiyonların tanısında değer taşımaktadır (36,37,42). Laboratuvara gönderilen idrar, doku ve vücut sıvıları gibi steril örnekler kültür yapılmadan önce herhangi bir işleme alınmazken, diğer bakterilerle kontamine olan balgam gibi örneklerin dekontamine edilmesi gereklidir. Dekontaminasyon için en sık kullanılan yöntem, N-asetil-L-sistein sodyum hidroksit (NALC-NaOH) yöntemidir (36,42).

Direkt İnceleme

Mikobakterilerin laboratuvar tanısında ilk basamak, her zaman mikroskopik inceleme olmaktadır. Bu amaçla, aside dirençli boyama yöntemlerinden EZN (sıcak boya) ve Kinyoun (soğuk boya) boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca örnekler, fluorokrom boyama yöntemi ile de incelenebilir (19). Bu yöntemlerin duyarlılığı (5.000-10.000 basil/ml balgam) ve özgüllüğü düşük olmakla beraber, bir klinik örnekte aside dirençli bakterilerin görülmesi antitüberküloz tedaviye başlanması için yeterli bir kriterdir. Mikobakteriyoloji laboratuvarı, boyalı preparatların mikroskopik inceleme sonuçlarını 24 saat içinde rapor etmelidir. Bildirim şekli, Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi (Center for Disease Control and Prevention: CDC)'nin önerilerine göre yapılmalıdır (42).

Mikobakteri izolasyonu amacıyla kullanılan besiyerleri özelliklerine göre katı ve sıvı besiyerleri olarak ayrılabilir. Sıvı besiyerlerine, Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albumin besiyerleri örnektir. Bu besiyerleri, günümüzde mikobakteri stok suşlarının subkültürlerini yapmak amacıyla ve invitro testler ile ilaç duyarlılık testleri için kullanılmakta olup, pekçok hızlı kültür sisteminin ana besiyerini oluşturmaktadır (36,42).

Katı besiyerleri, yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere ikiye ayrılabilir. Yumurta bazlı besiyerlerinin uygun saklama koşullarında uzun süre korunabilmeleri, birçok

mikobakteri türünü etkili bir şekilde üretebilmeleri, besiyeri veya inoküle edilen örnek içindeki toksik maddeleri içerdikleri fosfolipidler sayesinde bağlayarak etkisiz hale getirmeleri, içerdği malaşit yeşili nedeniyle kontaminant bakterilerin üremelerini engellemeleri olumlu özellikleridir. Koloni oluşumunun erken saptanmasındaki zorluk ve ilaç duyarlılık testlerinde ilacın besiyerinde dengeli konsantrasyonlarda dağılamaması ise yumurta bazlı besiyerlerinin dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bu besiyerlerine, Löwenstein-Jensen (LJ), Petregani ve American Torasic Society (ATS) besiyerleri örnek verilebilir (36,37,42).

Agar bazlı besiyerleri, transparan olmaları nedeniyle, yumurta bazlı besiyerlerinde 18-24 günde saptanan kolonilerin, mikroskopik büyüklükte iken bile 10-12 günde saptanmalarına olanak sağlar. Agar bazlı besiyerlerin saklanma sürelerinin oldukça kısa olması ve ısı ile ışığa maruz kalmaları sonucunda özelliklerinin bozulması, yumurta bazlı besiyerlerine göre dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bu besiyerlerine Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 örnek verilebilir (42).

Bu klasik kültür yöntemlerine ilave olarak günümüzde tüberküloz basilinin daha hızlı üremesini ve üremelerin erken dönemde tespit edilmesini amaçlayan hızlı, manuel veya otomatize, üreme indikatörlerine göre üremeyi radyometrik, floresan veya kolorimetrik olarak değerlendirilebilen kültür sistemleri, mikobakteri laboratuvarlarının rutinleri arasına girmiştir. Bu sistemlerde ağırlıklı olarak sıvı besiyerleri kullanılmakla beraber, bifazik ve katı besiyerleri de kullanılmaktadır. Hızlı kültür sistemlerinin çoğu, mikobakterilerin izolasyonu yanısıra, MTK üyelerini diğer mikobakterilerden ayırabilmekte, primer tüberküloz ilaçlara karşı olan duyarlılıkları saptayabilmektedir (42,75).

DSÖ, mikobakterilerin izolasyonu amacıyla sıvı ve katı iki ayrı tüberküloz besiyerinin aynı anda beraber kullanılmasını önermektedir. Pek çok ticari hızlı kültür sistemi vardır. Hastanemizin mikobakteriyoloji laboratuvarında, tüberküloz tanısında rutin olarak LJ katı besiyeri ile DSÖ'nün standart olarak önerdiği BACTEC 460 TB hızlı, sıvı kültür sistemi kullanılmaktadır (42).

MOTT infeksiyonlarında, özgül klinik bulgular yoktur. Kesin tanı, mikrobiyolojik inceleme sonucunda konur. Kültürde üretilen mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması çok sayıda biyokimyasal test ile yapılmaktadır. Bunlar arasında niasin, arilsülfataz ve katalaz testleri, pirazinamidaz ve üreaz üretimi, nitrat ve tellürit redüksiyonu, Thiophene-2-carboxylic acid hidrazide (T2H) inhibisyonu, Tween 80 hidrolizi ve sodyum klorür tolerans testi sayılabilir (36,42,75). Bunlardan katalaz testi, *M.tuberculosis*, *M.gastri* ve *M.kansasii*'yi diğer

mikobakterilerden ayırt edebilmek amacıyla kullanılır. Tüm mikobakteriler katalaz olumlu sonuç verir iken, bu üç mikobakteri olumsuz sonuç verir. McConkey agarda üreme testi, *M.fortuitum* ile *M.chelonae*'nin diğer mikobakterilerden ayrılmasını sağlar. Niasin testi, *M.tuberculosis*'in tanımlanmasını sağlar. *M.tuberculosis*'in üreme esnasında besiyeri ortamına saldığı niasin, siyonajen bromür veya anilin eriyiği gibi ayıraçlarla saptanır ve *M.tuberculosis*'in varlığı doğrulanır. Pirazinimidaz testi, bazı mikobakterilerin pirazinamidi pirazinoik aside parçalaması esasına dayanır. Bu test ile *M.tuberculosis*, MAK ve *M.marinum* olumlu, *M.bovis* ile *M.kansasii* ise olumsuz sonuç verir. T2H testi ise *M.tuberculosis* ile *M.bovis*'i birbirinden ayırmak için kullanılır (42,75).

Biyokimyasal testler belli mikobakteri türlerinin birbirlerinden ayırt edilmesini sağlayabilmektedir. Ayrıca kesin tanımlama yapılabilmesi için bu testlerin tamamının uygulanması gerekmektedir ve bu işlemler fazla zaman aldığından rutin olarak kullanıma uygun değildir (16,376,42).

2. Moleküler Tanı Yöntemleri

Klinik örneklerde saptanan mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması amacıyla kullanılan biyokimyasal testler yerine günümüzde hızlı, kolay uygulanabilen moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Bunlar doğrudan örnekten ve kültürden çalışılan yöntemler olarak basitçe ikiye ayrılabilir (23,78).

a. Klinik örneklerden mikobakterilerin moleküler yöntemler ile doğrudan saptanması

M.tuberculosis'in de içinde bulunduğu birçok mikobakteri türü, laboratuvarlarda son derece yavaş ürer. Üremeleri için katı bazlı besiyerlerinde 3-8 haftaya, BACTEC gibi sıvı bazlı besiyerlerinde ise asgari iki haftaya ihtiyaç duyulur (23,42). Bu durum, tüberküloz hastalığının tanısında, dolayısıyla tedavisinin düzenlenip yönetilmesinde gecikmelere yol açar. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri, klinik örneklerden mikobakterilerin DNA veya RNA'larının doğrudan saptanmasına olanak vermektedir. The Food and Drug Administration (FDA), klinik örneklerden *M.tuberculosis* saptanması için iki nükleik asit çoğaltma yöntemine onay vermiştir (23,78). Bunlar *M.tuberculosis* Direct test (E-MTD; Gen-Probe, San Diego, CA, A.B.D.) ve The Amplicor *M.tuberculosis* Test (Amplicor; Roche Diagnostic Systems Inc., Branchburg, NJ, A.B.D.)

E-MTD

Bu test transkripsiyona bağılı çoğaltma (Transcription-Mediated Amplification: TMA) temeline dayanır. Bu yöntemde çoğaltılan hedef nükleik asit, rRNA'dır. Önce RNA'nın "reverse transcriptase" (RT) enzimi ile DNA kopyası çıkarılır. Bu sırada kullanılan primerin 5' ucunda bulunan bir promotor dizi, elde edilen ürünün içerisine yerleştirilmiş olur. RT enzimi cDNA-RNA hibritleri oluştururken, aynı zamanda RNAz-H aktivitesi ile de sentez sırasında RNA'yı ortadan kaldırır. İkinci bir primer ile RT'nin DNA polimeraz aktivitesi ile çift zincirli cDNA oluşur. Ortamdaki RNA polimeraz, promotor bölgeden başlayarak çift zincirli DNA'dan çok sayıda tek zincirli RNA kopyası yapar. Ürünler akridinyum ile işaretlenmiş özgül problemlerle hibridize edilir. Akridinyum parçalanarak açığa çıkan ışık, luminometrede ölçülür. Polimerase Chain Reaction (PCR: Polimeraz Zincir Tepkimesi)'dan farklı olarak bu işlemler izotermaldir ve tek tüpte yapılmaktadır. Bu da taşımadan kaynaklanan kontaminasyon riskini azaltmaktadır (23,39,78).

Amplificor

PCR esaslı bir testtir. Bu yöntemde, mikobakteri DNA'sının 16S rRNA gen bölgesine ait tür spesifik primerler ve işaretli MTK'ya ait problemler kullanılır (23).

Amplificor ve E-MTD testinin karşılaştırılması

Test	Amplificor	E-MTD
Firma	Roche	Gen-Probe
Çoğaltma tekniği	PCR	TMA
Hedef Bölge	16S rRNA	rRNA
Analitik duyarlılık	≥20 organizma	Bilgi yok
Klinik duyarlılık	%79.4-91.9	%90.9-95.2
Klinik özgüllük	%99.6-99.9	%98.8-100
EZN negatif örnekler için duyarlılık	%40-73.1	%83-90
Pozitif prediktif değer	%92.6-96.6	%83.3-100
Negatif prediktif değer	%98.6-98.7	%98.4-99.6
İnhibitör faktörlerin kontrolü	Evet	Hayır
Kontaminasyondan korunma	Evet	Hayır
Dekontaminasyon+işlem zamanı	6.5 saat	3.5 saat

Cihazlar	Thermocyclers, fotometre	Isı blokları, luminometre
FDA izin verdiği örnekler	EZN pozitif	EZN (+) ve (-)

Bu iki yöntem, FDA onayı olmamasına rağmen solunum yolu örnekleri dışında da kullanılmakta olup bunların solunum yolu örnekleriyle benzer performansa sahip oldukları bulunmuştur (23,78).

b. Mikobakterilerin moleküler yöntemler ile kültürden saptanması

DNA Dizi Analizi

Mikobakterilerin tanımlanması amacıyla hedef olarak seçilen en önemli gen bölgeleri, 16S rRNA, *hsp65*, 16S-23S rRNA ITS, *gyrB*, *recA* ve *rpoB* genleridir (7,24,59,61,64,65,66,72). 16S rRNA gen bölgesi, bakterilerin moleküler tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilen bir hedef bölgedir. Çünkü her bakteriye ait çok iyi korunmuş diziler içerir. Aynı zamanda her türe göre değişen dizilere sahiptir (7,59,64,72). 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 analiz servisleri mevcuttur (64,72). Bu servislerden biri olan RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms; <http://www.ridom.de>), web tabanı üzerinde dizi analizi yanısıra, fenotipik ve genotipik özellikleri de sunmaktadır. Ayrıca dizi analizi amacıyla üretilmiş ticari kitle 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 tanımlama gerçekleştirmektedir(31,39).

16s rRNA dizilerinin karşılaştırılması mikobakterilerin tanımlanmasında güvenilir bir yöntem olmakla birlikte, *M.gastri* ve *M.kansasii* gibi bazı türlerin ayırt edilmesinde yetersiz kalabilmektedir. Bu gibi türlerin tanımlanması amacıyla, *recA*, *hsp65*, *gyrB*, 16S-23S rRNA ITS, *dnaJ*, *rpoB* gen dizilerinin karşılaştırılmasından da faydalanılmaktadır (59,64,65,72).

Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis

Mikobakterilerin tanımlanmasında ve ilaç direncine neden olan mutasyonların hızlı şekilde saptanmasında kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde hedef gen ve/veya rifampisin direncinden sorumlu gen bölgesi, PCR ile çoğaltılır (14,39). Çoğaltılan çift zincirli DNA, ısı ile denatüre edilerek tek zincirler elde edilir. Tek zincirlerin renatürasyonu sonrasında, farklı dizilerdeki parçalar değişik 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 tanımlanmasında da kullanılmaktadır (14,17,20,28).

Mikobakteri türlerinin tanımlanmasına yönelik olarak geliştirilmiş olan bir yöntem de, mikobakteriyel 16S rRNA geninin değişken bölgelerine spesifik dört ayrı çift iplikli 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 (20,28,32).

Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri (DNA Prob Teknolojileri)

Ticari DNA problemleri (AccuProbe®) klinik olarak önemli olan bazı mikobakteri türlerinin (*M.tuberculosis*, *M.avium*, *M.intracellulare*, MAK, *M.kansasii* ve *M.gordonae* gibi) tanımlanmasında kullanılmaktadır (55,75). Kültürde üremiş bakterilerden çalışılan, kolay uygulanabilen, özel cihazlara gereksinim duyulmayan ve yaklaşık iki saatte sonuç alınan bir yöntemdir. DNA prob teknolojisindeki gelişmeler ile birlikte, bu alanda birçok ticari kit geliştirilmiştir. Örneğin, AccuProbe® (Gen-Probe, San Diego, A.B.D.) gibi ticari DNA problemleri ile INNO-LiPA® Mycobacteria (Innogenetic N.V., Ghent, Belçika) ve GenoType® Mykobakterien (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Almanya) gibi tek basamakta MTK'nın da dahil olduğu 16 mikobakteri türünü saptayan ve tanımlayan ticari kitler bugün kullanılmaktadır (30,49,55,67,71).

Özellikle otomatize ve yarı otomatize sistemlerin geliştirilmesiyle daha kısa sürede üretilen mikobakteriler, 1980'li yıllardan itibaren DNA problemleri ile erken dönemde doğrulanabilmektedir. Duyarlılık ve özgüllükleri yüksektir (42). DNA problemlerinin en büyük dezavantajı, her seferinde sadece bir mikobakteri türünün test edilebilmesi ve MTK üyelerini

ayıramamasıdır. Sınırlı sayıda tür için bulunan problemler, klinik laboratuvarlarda sıklıkla izole edilen türlerin tanımlanmasında biyokimyasal testlere gereksinimi ortadan kaldırmaktadır (45,55,67).

DNA Microarray

Çok sayıda DNA dizilerinin tek hibridizasyon basamağında hızlı olarak taranmasına olanak sağlar. Bu yöntem önceleri sadece gen ekspresyonu ve genomik içerik incelenmesinde kullanılırken, son yıllarda değişik türlerin aynı anda tanımlanması ve mutasyonların saptanmasında kullanılmaktadır. Mikobakterilerin tanımlanması ve rifampisin direncinin saptanması da buna örnektir (19,23,39).

PRA Yöntemi

İlk kez Plicaytis ve ark. tarafından mikobakterilerin tanımlanması için geliştirilmiş bir yöntemdir (62). *Mycobacterium* cinsine spesifik olup, mikobakteri türleri arasında değişiklik gösteren gen bölgelerinin PCR ile çoğaltıldıktan sonra enzimlerle kesilmesi prensibine dayanmaktadır (42). Mikobakterilerin tanımlanmasında hedef olarak seçilmiş olan en önemli gen bölgeleri, 16S rRNA, *hsp65*, *recA* ve *rpoB*, 16S-23S rRNA ITS genleridir (8,13,47,63,65,68,70,71). 65 kDa ağırlığındaki “heat shock protein” genini (*hsp65*) hedef alarak yapılan PCR-restriksiyon enzim analizi çalışmalarında, iki özgül primer kullanılarak çoğaltılan ürünler, *BstEII* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleriyle kesilmektedir. Elde edilen restriksiyon parçaları, poliakrilamid jelde yürütülerek ayrıştırılmaktadır. Bu yöntemle 70’e yakın mikobakteri türü tanımlanmıştır (8,13,70).

III - GEREÇ VE YÖNTEM

A. ÖRNEKLER

Bu tez çalışmasında, Mart 2001 ve Nisan 2003 tarihleri arasında GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen MOTT suşları ile, daha önceki yıllarda izole edilen MOTT suşları kullanıldı. Kord oluşumunun gösterilmesi için, radyometrik BACTEC 460 TB sistemi ile Mart 2001 ve Nisan 2003 tarihleri arasında izole edilen 153 mikobakteri izolatu çalışmaya dahil edildi.

Örneklere uygulanan işlemler: Tüberküloz olduğu düşünülen hastalardan gönderilen pulmoner (balgam, bronş yıkama sıvısı, plevral sıvı, gastrik aspirat) ve ekstrapulmoner (idrar, periton sıvısı, beyin omurilik sıvısı, abse içeriği, eklem sıvısı, ejakulat, gaita, prostat sıvısı, biyopsi materyali, perikardiyal sıvı, kemik iliği, üretral akıntı) örnekler işleme alındı. Tüm örnekler, öncelikle CDC tarafından önerilen NALC-NaOH yöntemiyle dekontamine ve homojenize edildi (42). Her örnek fosfat tamponu (pH=6.8) ilave edilerek 15-20 dakika 3000xg'de santrifüj edildikten sonra elde edilen sediment, beş ml. fosfat tamponu ile tekrar sulandırıldı. Laboratuvarımızda, DSÖ'nün önerdiği şekilde klasik LJ katı ve radyometrik BACTEC 7H12B sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. Sulandırılan sedimentten 100 µl, PANTA antibiyotik supplementi (2000 U/ml polimiksin B, 200µg/ml amfoterisin B, 800µg/ml nalidiksik asit, 200µg/ml trimetoprim, 200µg/ml azlosilin) içeren BACTEC 7H12B sıvı besiyerine ekilerek 37°C'de altı hafta süresince inkübasyona bırakıldı. BACTEC şişeleri ilk üç hafta haftada üç kez, daha sonraki üç haftada ise bir kez BACTEC 460 TB cihazında okutularak büyüme indeksleri değerlendirildi. Büyüme indeksi ≥ 10 olan örnekler pozitif, altı hafta sonunda büyüme indeksi < 10 olan örnekler ise negatif olarak kabul edildi. MTK ve MOTT'ların ayrımı p-nitro- α -acetyl-amino- β -hydroxypropiofenone (NAP) testi ile yapıldı (69). Sulandırılan aynı sedimentten 100 µl, antibiyotiksiz LJ besiyerine ekildi ve besiyeri haftada bir kez üreme yönünden kontrol edilerek sekiz hafta süresince %5-10 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Ekim için hazırlanan örneklerden ve pozitif bulunan BACTEC şişelerinden sonucu doğrulamak amacıyla mikroskopik inceleme için preparat hazırlanarak EZN yöntemi ile boyandı.

B. KULLANILAN YÖNTEMLER

MOTT'ların tanımlanmasında, EZN boya yöntemi ile kord oluşumunun değerlendirilmesi ve PRA yöntemi kullanıldı.

1. KORD OLUŞUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ:

Yöntem: EZN boyama prosedürü kullanıldı. (42)

1. Üreme olan BACTEC 7H12B şişelerinden 100 µl örnek lam üzerine konuldu.
2. 50 µl tavşan serumu eklenerek örnek, lam üzerine yayıldı.
3. Preparat oda ısısında kurutulduktan sonra alevde tespit edildi.
4. Lam üstünü kaplayacak şekilde karbolfuksin döküldü.
5. Alttan alev geçirilerek 1-2 dakika kaynatılmadan ısıtıldı.
6. Distile su ile yıkandı.
7. %3'lük asit alkol ile 1-2 dakika renksizleştirme işlemi yapıldı ve distile su ile yıkandı.
8. Lam üstünü kaplayacak kadar metilen mavisi konularak 1-2 dakika beklendi ve distile su ile yıkanıp x100 objektifte immersiyon yağı ile incelendi.

2. PRA YÖNTEMİ

Dört basamaktan oluşmaktadır: DNA ekstraksiyonu, PCR, restriksiyon, poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ile görüntüleme.

1) DNA ekstraksiyonu

a) Gereçler:

Muhtelif mikropipetler (Biohit Proline Pipette/Finlandiya)

Mikrofüj tüpleri 1.5 ml (Eppendorf Sigma/Almanya)

Mikrofüj (Eppendorf Centrifuge 5417R/Almanya)

b) Reaktifler:

1M TRIS Stok Çözeltisi (pH 8.0):

Trisbase (Sigma)	121.1 g
Steril distile su	1000 ml'ye tamamlandı.
pH, HCl ile ayarlandı (çözme işlemleri 750 ml'de yapıldı).	

0.5M EDTA Stok Çözeltisi (pH 8.0):

EDTA (Sigma)	186.1 g
Steril distile su	1000 ml'ye tamamlandı
NaOH yardımıyla çözüldü. HCl ile pH ayarlandı (çözme işlemleri 750	

ml'de yapıldı).

TE Tamponu (pH 8.0):

1M TRIS	1 ml
0.5M EDTA	0.2 ml
Steril distile su	100 ml'ye tamamlandı.

c)Yöntem:

13,16 nolu kaynaklardan modifiye edilerek uygulandı.

1. Mikobakteriler, BACTEC 7H12B şişelerinden mikrofüj tüplerine 500 µl veya LJ besiyerlerinden bir öze dolusu alınarak, içinde 500 µl TE tamponu bulunan mikrofüj tüpüne aktarıldı.
2. Tüpler, 7000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi.
3. Üst sıvı atıldı. Çökelti üzerine 500 µl TRIS-EDTA (etilen diamin tetra-asetat) (TE) tamponu eklenerek vortekslendi ve 5000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi.
4. Üst sıvı atıldı. Çökelti üzerine 300 µl TE tamponu eklenerek vortekslendi ve 7000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi.
5. Üst sıvı atıldı. Çökelti üzerine 300 µl TE tamponu eklenerek vortekslendi ve 20 dakika kaynar su banyosunda bekletildi.
6. Tüpler 10000 rpm'de beş dakika santrifüj edildikten sonra, bakteri DNA'sını içeren üst kısımdan 200 µl, iki ayrı mikrofüj tüpüne aktarıldı ve tüpler -20°C'de saklandı.

2) PCR: Kullanılan malzemeler ve yöntemlerin uygulanışı aşağıda verildi.

a)Gereçler:

Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Mini Sub Cell GT System/BioRad/ABD)

Hassas terazi (Precisa 125 A SCA/İsveç)

Jel görüntüleme sistemi (GelDoc/BioRad/ABD)

Muhtelif Mikropipetler (Biohit Proline Pipette/Finlandiya)

pH metre (EMAF/Türkiye)

Mikrofüj (Eppendorf Centrifuge 5417R/Almanya)

Thermal cycler cihazı (MJ Research/İngiltere)

b) Reaktifler:

Agaroz (Genaxis/Almanya)

Etidyum Bromid (Boehringer Mannheim/Almanya): 10 mg/ml (steril distile su içinde)

Mineral oil (Sigma/Almanya)

Standart suş H37 Ra

Primerler (Operon technology)

Tb11⇒ 5' -ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3'

Tb12⇒ 5' -CTTGTCGAACCGCATACCCT-3'

PCR Ölçü Birimi (Ambresco/ABD): 50-2000 kb arası 8 band

PCR Ölçü Birimi (Diomed/Türkiye): 79-441 kb arası 8 band

Thermus aquaticus (Taq) DNA Polimeraz (Fermentas/Almanya): 10X PCR buffer ile MgCl₂ içermektedir.

Yükleme tamponu:

%40 Sukroz (Sigma/Almanya): %40 (distile su içinde, w/v)

Orange-G (Sigma/Almanya): %0.25

TBE 5X hazırlanışı

Trisbase (Sigma/Almanya)	54 gr/lt
Borik asit (Sigma/Almanya)	27.5 gr/lt
EDTA	20 ml/lt [0.5 M (pH:8,0)]

%2'lik agaroz jel hazırlanışı

Agaroz	0.400 g
TBE 0.5X	20 ml

c) Yöntem:

Ana karışım için	Distile su	30 µl
	10X buffer	5.1 µl
	25 mM MgCl ₂	3 µl
	dNTP Mix 2.5 mM	4 µl
	Tb 11 primer 20 pmol	2.5 µl
	Tb 12 primer 20 pmol	2.5 µl
	Taq DNA polimeraz	0.5 µl
	DNA örneği	3 µl

Hazırlanan karışımlar "thermal cycler" cihazına yerleştirildi. PCR döngüleri, Brunello ve ark'nın çalışmasından modifiye edilerek şu şekilde uygulandı.

94 °C 3 dakika (denatürasyon) 1 döngü

94 °C 45 saniye (denatürasyon) }
56 °C 1 dakika (birleşme) } 44 döngü
72 °C 1 dakika 30 saniye (uzama)

72 °C 4 dakika 1 döngü

4 °C +∞

1. Çoğaltma işlemi sonucu elde edilen olan PCR ürünleri, içine 0.5 µg/ml etidyum bromid eklendi ve 0.5X TBE kullanılarak hazırlanan %2'lik agaroz jelde yürütüldü.
2. Jelin ilk kuyucuğuna PCR ölçü birimi, diğer kuyucuklara ise yükleme tamponuyla karıştırılmış PCR ürünleri yüklendi.
3. Elektroforez işlemi, 100V'da 20 dk. süreyle gerçekleştirildi.
4. DNA band görüntüleri UV ışık altında GelDoc görüntüleme sistemi yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı.
5. PCR ürünleri olan 461 bp'lik örnekler, ikinci aşama olan enzim kesim işlemine alındı.

3) Restriksiyon Enzim Analizi.

a) Gereçler:

Elektroforez tankı ve güç kaynağı (ProteanII XI CELL System/BioRad/ABD)

Hassas terazi (Precisa 125 A SCA/İsveç)

Jel görüntüleme sistemi (GelDoc/BioRad/ABD)

Muhtelif mikropipetler (Biohit Proline Pipette/Finlandiya)

pH metre (EMAF/Türkiye)

Mikrofüj (Eppendorf Centrifuge 5417R/Almanya)

b) Reaktifler:

Etidyum Bromid (Boehringer Mannheim/Almanya): 10 mg/ml (steril distile su içinde)

Mineral oil (Sigma/Almanya)

HaeIII RE mix (Diomed/Türkiye)

BstEII RE mix (Diomed/Türkiye)

PCR Ölçü Birimi DiO-Myker B (Diomed/Türkiye): 79-441 kb arası 8 band

PCR Ölçü Birimi DiO-Myker H (Diomed/Türkiye): 40-152 kb arası 8 band

Yükleme tamponu: %40 Sukroz (Sigma/Almanya): %40 (distile su içinde, w/v)
Orange-G (Sigma/Almanya): %0.25

TBE 5X hazırlanması

Trisbase (Sigma/Almanya)	54 gr/lt
Borik asit (Sigma/Almanya)	27.5 gr/lt
EDTA	20 ml/lt [0.5 M (pH:8,0)]

Akrilamid/Bisakrilamid (30:1) hazırlanışı

Akrilamid (Sigma/Almanya)	30 gr
Bisakrilamid (Sigma/Almanya)	1 gr.

Steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Filtre kağıdından süzülerek, ışık geçirmeyen (şişe ve/veya ortamda) +4°C'de saklandı.

Amonyum persülfat (APS) %10 hazırlanışı

Amonyum persülfat (Sigma/Almanya)	1 gr
Deiyonize su	10 ml

Poliakrilamid jel hazırlanışı (%12)

Deiyonize su	11.79 ml
5X TBE	6 ml
Akrilamid/bisakrilamid 30:1	12 ml
APS	210 µl
Temed	10.5 µl

c) **Yöntem:**

1. Her örnek için iki mikrosantrifüj tüpü (500 µl), enzim kesim karışımı için hazırlandı (*BstEII* ve *HaeIII*).
2. 10'ar µl PCR ürünü tüplere dağıtıldı.
3. 2.5 µl *BstEII* enzim karışımı ve 2.5 µl *HaeIII* enzim karışımı tüplere eklendi.
4. Tüpler, inkübasyon için etüvlere kaldırıldı.

<i>BstEII</i> enzim için	60 °C 5 saat
<i>HaeIII</i> enzim için	37 °C 5 saat
5. İnkübasyondan sonra, 5 µl yükleme tamponu tüplere eklendi ve vortekslendi.
6. Örneklerden 10 µl alınarak %12'lik poliakrilamid jele yüklendi.

7. Her jel için ilk kuyucuğa 5µl DİO-MYKER B ve son kuyucuğa 5 µl DİO-MYKER H yüklendi.
8. Jel, soğutmalı elektroforez tankında 0.5X TBE tamponu içinde 150V gerilim uygulanarak 2 saat yürütüldü.
9. Jel, etidyum bromid çözeltisinde (1 µl/ml) 30 dakika çalkalanarak boyandı.
10. Jel görüntüleri, UV ışık altında GelDoc jel görüntüleme sistemi ile bilgisayar ortamına aktarıldı ve enzim kesim bölgelerine göre tür tayini için incelendi.



IV - BULGULAR

A. İzolatlar

Mikobakteriyoloji laboratuvarımıza, 2001-2002 yılları arasında, tanı koymak amacıyla, hastanemizin çeşitli kliniklerinde tüberküloz olduğu düşünülen toplam 2749 hastadan alınan 5705 çeşitli hasta örneği gönderilmiştir. Tüberküloz olduğu şüpheli hastalardan iki yıl süresince toplam 165 tanesinin 341 örneğinde MTK, dört farklı hastanın ise dört örneğinde MOTT saptanmıştır. Yıllara göre dağılımlarına bakılacak olursa; laboratuvarımıza 2001 yılında 1331 hastadan 2736 örnek gönderilmiş, bu hastaların 102 tanesinden (%98.1) 239 MTK suşu ve iki tanesinden (%1.9) iki MOTT suşu; 2002 yılında ise 1418 hastadan 2969 örnek gönderilmiş, bu hastaların 63 tanesinden (%96.97) 102 MTK suşu ve iki tanesinden (%3.07) iki MOTT suşu izole edilmiştir. MTK kültür pozitif hastaların yaş aralığı 2-78 yıl aralığında olup yaş ortalaması 26.17 ± 13.11 yıldır. MOTT kültür pozitif hastaların ise yaş ortalaması 45.5 ± 13.99 'dur. MOTT suşu izole edilen hastaların tümü, poliklinikten takip edilen hastalardır. MOTT izolatlarının tümünün direkt bakıları ve LJ kültür sonuçları negatiftir.

B. Kord oluşumu

Kord oluşumunun değerlendirilmesinde, BACTEC 7H12B kültürlerinde üreyen 153 mikobakteri suşu alındı. Mikroskopik inceleme sonucu 149 mikobakterinin kord oluşumu gösterdiği (MTK), dört tanesinin kord oluşumu göstermediği (MOTT) tespit edildi. Kord oluşumları, NAP TB ayırım testi ile karşılaştırıldığında, bu çalışma için duyarlılık ve özgüllük %100 olarak bulundu. Kord olumlu (MTK) ve kord olumsuz (*M.gordoniae* tip 3) mikobakterilerin EZN boyalı preparatlarının mikroskopik görüntüleri (Resim 1 ve 2)'de gösterildi.



Resim 1: MTK



Resim 2: *M.gordoniae* tip 3

C. PRA

Laboratuvarımızda 2001-2002 yılları arasında izole edilen dört MOTT izolatu ve daha önceki yıllarda izole edilerek -20°C’de saklanan 13 MOTT suşunun, *hsp65* PRA yöntemiyle tür tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar ve hasta bilgileri (Tablo III ve IV)’de verildi.

Tablo III. 2001-2002 yılları arasında izole edilen MOTT türleri ve hasta özellikleri

Yaş/Cins	Mikobakteri türü	Örnek	Klinik tanı	Geldiği bölüm
48/E	<i>M.gordonae</i> tip1	Balgam	Akc. tüberkülozu?	Göğüs AD. plk.
64/K	<i>M.gordonae</i> tip 3	BAL	Akc. tüberkülozu?	Göğüs AD. plk
38/E	<i>M.gordonae</i> tip 3	BAL	Akc. tüberkülozu?	Göğüs AD.plk
24/E	<i>M.gordonae</i> tip 5	Plevral mayi	Plevral efüzyon?	Göğüs AD. plk

E: Erkek, K: Kadın

Tablo IV. Tür tayini yapılan mikobakteri suşları ve oranları

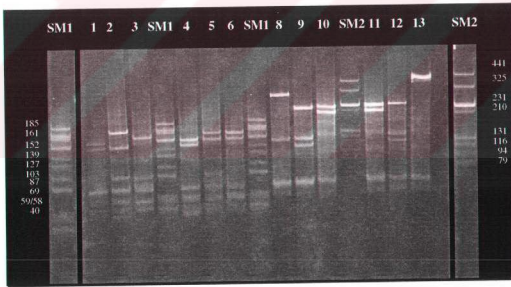
Suş	Sayı	Yüzde
<i>M.gordonae</i> tip 1	3	17.6
<i>M.gordonae</i> tip 3	3	17.6
<i>M.gordonae</i> tip 5	1	5.9
<i>M.gordonae</i> tip 7	4	23.5
<i>M.abscessus</i> tip 1	1	5.9
<i>M.intracellulare</i> tip1	1	5.9
<i>M.nonchromogenicum</i> tip 2	1	5.9
<i>M.thermoresistibile</i>	1	5.9
<i>M.genavense</i>	2	11.8
TOPLAM	17	100

PRA sonucu oluşan bant paternleri değerlendirilirken, tür tanı cetveli (algoritma) olarak <http://www.hospvd.ch:8005/> web sitesinden ve Telenti, Devallois ve Brunello ve ark.nın geliştirdiği tür tanı cetvelinden yararlanıldı (8,13,16). Çalışmamızda tanımlanan MOTT'lara ait standart enzim kesim paternleri (Tablo V)'de, seçilmiş örneklerle ait PRA bant paternleri, (Şekil 1, 2 ve 3)'te gösterildi.

MOTT tür tanı cetveli (algoritma) kullanımı; *BstEII* enzim kesim paternlerine göre MOTT'lar gruplara ayrıldı (sekiz). Grup tespit edildikten sonra *HaeIII* enzim kesim paternlerine göre tür tayini yapıldı (8,13,16).

Tablo V. Çalışmamızda tanımlanan MOTT türlerinin enzim kesim paternleri

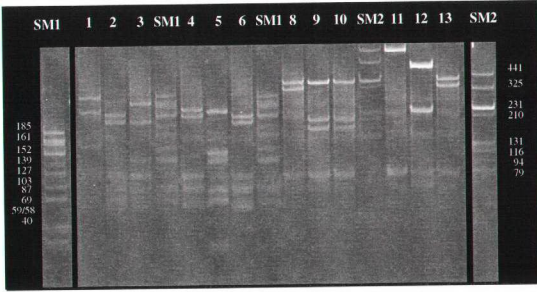
TÜR	<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>
<i>M.gordonae</i> tip 1	231/116/79	160/115/60
<i>M.gordonae</i> tip 3	231/116/94	127/112
<i>M.gordonae</i> tip 5	231/210	140/115
<i>M.gordonae</i> tip 7	231/116/94	161/112/60
<i>M.abscessus</i> tip 1	231/210	145/60/52/48
<i>M.nonchromogenicum</i> tip 2	310/131	140/60/55
<i>M.thermoresistible</i>	231/210	178/134/72/50
<i>M.intracellulare</i> tip1	231/116/94	145/127/60
<i>M.genavense</i>	325/116	130/110



Şekil 1: PRA Kesim Paternleri

SM1: DioMed-MykerH, SM2: DioMed-MykerB

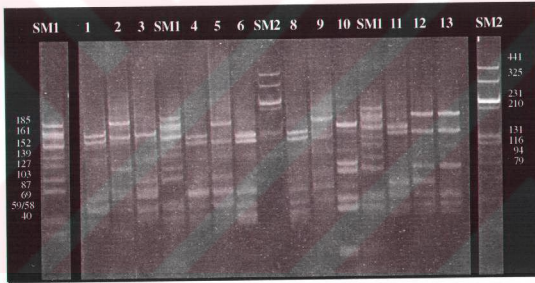
1., 2., 3., 4., 5., 6. yollarda *HaeIII*, 8., 9., 10., 11., 12., 13. yollarda *BstEII* enzim kesim ürünlerinin bant paternleri görülmektedir. Soldan itibaren MAK (1-13) (kontrol klinik izolat), *M.intracellulare* tip1 (2-12), *M.gordonae* tip 5 (3-11), *M.abscessus* (4-10), *M.gordonae* tip 7 (5-9), *M.genavense* (6-8)



Şekil 2. PRA Kesim Paternleri

SM1: DioMed-MykerH, SM2: DioMed-MykerB

1., 2., 3., 4., 5., 6. yollarda *Hae*III, 8., 9., 10., 11., 12., 13. yollarda *Bst*EII enzim kesim ürünlerinin bant paternleri görülmektedir. *M.thermoresistible* (1-8), *M.gordonae* tip3 (2-9), *M.gordonae* tip7 (3-10), MAK (4-11), *M.nonchromogenicum* (5-12), *M.gordonae* tip5 (6-13)



Şekil 3. PRA Kesim Paternleri

SM1: DioMed-MykerH, SM2: DioMed-MykerB

*Hae*III enzim kesim paternleri: Sol baştan; MAK, *M.thermoresistible*, *M.abscessus* tip 1, *M.genavense*, *M.gordonae* tip7, *M.genavense*, *M.gordonae* tip1, *M.rhodesia* (kontrol klinik izolat), *M.nonchromogenicum*, *M.gordonae* tip1, *M.gordonae* tip7, *M.gordonae* tip7

V. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda çoğunluğu çevreden ve hayvanlardan izole edilmiş, 100'e yakın mikobakteri türü tanımlanmıştır. Mikobakterilerin 20'den fazla türünün insanlarda enfeksiyona yol açtığı, klinik örneklerden izole edilerek gösterilmiştir. İmmün yetmezlikli ve özellikle 1980'lerden sonra epidemisi görülen AIDS'li hastaların sayısındaki artış, MOTT enfeksiyonlarının insidansında da artışa yol açmıştır (42,49). MOTT enfeksiyonlarındaki izlenen bu durum, bu hastalıkların tedavilerinin doğru bir şekilde düzenlenmesini ve sağlıklı epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesini gerekli kılmıştır. Bu nedenle, mikobakterilerin hızlı ve güvenilir bir şekilde tür düzeyinde tanımlanması zorunlu hale gelmiştir (33,47).

Mikobakteri enfeksiyonlarında etkenin geleneksel tanı yöntemleriyle izole edilebilmesi ve tanımlanabilmesi, son derece zor ve zaman alıcıdır. Bu durum mikobakterilerin tanımlanmasını ve uygun tedavilerinin başlanmasını geciktirmektedir (70,77). Bu yüzden son yıllarda özellikle DNA dizi analizi, SSCP, PRA gibi yeni moleküler yöntemler ile, DNA prob teknolojisindeki gelişmeler sonucunda AccuProbe® (Gen-Probe, San Diego, USA) gibi ticari DNA problemleri ile INNO-LiPA® Mycobacteria (Innogenetic N.V., Ghent, Belgium) ve GenoType® Mykobakterien (Hain Lifesience GmbH, Nehren, Germany) gibi aynı anda mikobakteri saptanmasını ve tanımlanmasını yapan ticari kitler üretilmiştir (43,47,71,72).

Bu tez çalışmasında, kliniğimizde mikobakterilerin izolasyon, tanımlama ve antibiyotik duyarlılıklarını saptamak amacıyla kullanılan BACTEC 460 TB kültür sistemi ile klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerin EZN boyama ile kord oluşumunun incelenmesi ve kord oluşturmayan mikobakterilerin PRA yöntemiyle tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır.

MTK ve MOTT'ları ayırmak için yapılan araştırmalarda, pozitif BACTEC 7H12B şişelerinden hazırlanan preparatlarda mikobakteri türlerinin morfolojisinin, yani kord oluşumunun incelenmesinin, bu amaca uygun bir kriter olabileceği sonucuna varılmıştır (4,30,40,50,54). Çalışmamız süresince kültür pozitif MTK izolatları içinde kord negatif olarak tanımlanan izolatımız olmamıştır. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda ise, MTK izolatlarının %7.3-%11.8'inde kord oluşumu negatif bulunmuştur (4,40,50,80). Bu tez çalışmasında, MTK'ların tanımlanması için kord oluşumunun değerlendirilmesinde duyarlılık ve özgüllük %100 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar daha önce yapılan bir çok araştırmanın duyarlılık (%88.2-95) ve özgüllük (%95-100) değerlerinden yüksektir. (30,40,50,80).

Daha önce Kısa ve ark. ile beraber yaptığımız ve BACTEC 7H12B besiyerinde kord oluşumunun MTK ön tanısındaki güvenilirliği ile ilgili bir çalışmada, duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla %98.8, %95.0, %98.7, %95.0 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, bir MTK izolatu kord negatif olarak değerlendirilirken, bir MOTT izolatu da (*M.gordonae*) kord pozitif olarak saptanmıştır (35).

Bazı araştırmacılar, kord oluşumunun gösterilmesinde, deneyimlerinin zamanla arttığını belirtmişlerdir. Attori ve ark.ları çalışmalarında, eğitim sonrasında %18 oranında daha fazla kord tanımladıklarını ve altı MOTT'un beş (%83)'inde yalancı kord oluşumunu gerçek kord oluşumundan ayırdıklarını bildirmişlerdir (3,80). Bu nedenle, eğitimsiz ve tecrübesiz kişilerin, kord oluşumunu yalancı kord ile karıştırabileceklerini ve gerçek kord oluşumunu kaçırabileceklerini ifade etmişlerdir. Bu sonuçlar, çok deneyimli en az iki personelin kord oluşumunu değerlendirdiği çalışmamızdaki yüksek duyarlılık ve özgüllük oranlarını açıklayabilir kanaatindeyiz.

BACTEC kültürlerinden hazırlanan preparatlarda, MOTT'ların kord oluşturmaları nadiren görülebilir. Yapılan farklı çalışmalarda, MAK, *M.kansasii*, *M.szulgai*, *M.chelonae*, *M.gordonae*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum* izolatlarının kord pozitifliği gösterebildikleri belirtilmiştir (3,4,30,40,54). MTK izolatlarının prevalansının yüksek olduğu laboratuvarlarda tecrübeli personel tarafından kord oluşumunun incelenmesi, MTK izolatlarının hızlı tanısına ve antitüberküloz ilaç duyarlılık test sonuçlarının erken bildirilmesine katkıda bulunabileceği gibi, moleküler yöntemlerin seçimine de katkısı olmaktadır (35). Bu çalışmada, kord oluşumu göstermeyen mikobakteriler, doğrudan PRA yöntemi ile tanımlanmıştır. PRA yönteminin, kord oluşumu göstermeyen MTK üyelerini de tanımlayabilmesi, bu yöntemin diğer bir avantajıdır. Lebrun ve ark.ları, MTK tanısı için prob seçiminde, pozitif sinyal veren MB/Bact şişelerinden kord oluşumunu değerlendirmişler ve başarılı sonuçlar almışlardır (45).

Mikobakterilerin tanımlanmasında 16S rRNA bölgesinin dizi analizi, altın standart olarak kabul edilmektedir (72). Ancak bazı mikobakteri türlerinin tanımlanmasında bu yöntem yetersiz kalmaktadır. Örneğin, önemli bir patojen olan *M.kansasii* ile fırsatçı bir mikobakteri olan *M.gastri*'nin 16S rRNA gen dizileri aynıdır (7,31). Yine MTK üyelerinin bu hedef gen bölgesiyle ayrımı mümkün olmamaktadır. Yüksek oranda benzer gen dizilerine sahip *M.malmoense* ve *M.szulgai* veya *M.marinum* ve *M.ulcerans* ayırımında da problemler olmaktadır (34,64). Bu problemleri çözmek için, 16S rRNA bölgesine alternatif *Mycobacterium* cinsine özgül, mikobakteri türleri arasında değişiklik gösteren gen

bölgelerinin dizi analizleri kullanılmaktadır. Bu gen bölgeleri; *dnaJ*, *hsp65*, *rpoB*, 16-23S rRNA ITS, *recA*, *gyrB*'dir. Bu bölgelerin DNA dizi analizleri sonucunda problemlı türlerin ayrımı yapılabilmış, ancak MTK üyelerinin ayrımı yapılamamıştır (7,31,34,61,63,64.).

Dizi analizi yöntemleri, çok pahalı ekipmanlar ve karmaşık bilgisayar yazılım programları gerektirmektedir (64). Dizi analizi yöntemlerinde, elde edilen bakteri gen dizilerinin bilgisayar ortamında karşılaştırılması için standart gen dizilerine ihtiyaç vardır. Değişik kaynaklardan elde edilmiş standart gen dizilerinde zaman zaman farklılıklar da ortaya çıkabilmekte ve yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Bu amaçla, bir standardizasyonu sağlamak ve dizi analizi sonuçlarının güvenilirliğini artırmak amacıyla kurulmuş, günümüzde standart dizi analiz servisleri mevcuttur. Bu servislerden biri olan RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms; <http://www.ridom.de>), web tabanlı üzerinde dizi analizi yanısıra fenotipik ve genotipik özellikleri de sunmaktadır (25,59,64).

SSCP, DNA dizi analizinin alternatifi olarak, 1989 yılında geliştirilen bir yöntemdir. Daha çok mutasyonları belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (44). Son yıllarda mikobakterilerin tanımlanması için bu yöntemde bazı gelişmeler olmuştur. Multiple-Fluorescence PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism (MF-PCR-SSCP) yöntemi ile 16S rRNA geninin değişken bölgelerine ait dört ayrı parça, dört çift floresan primer ile çoğaltılarak elde edilen ürünleri SSCP analizi sonucu, MTK'larında dahil olduğu 30 mikobakteri türü tanımlanmıştır (20). Bu yöntem hızlı, kolay standartize edilebilen, duyarlı bir yöntem olmasına karşın, özellikle ilk kurulum aşamasında özel ekipman ve malzeme gerektiren pahalı bir yöntemdir. Elektroforez aşamasında, değerlendirme için bilgisayar desteği gerekmektedir (34,63). Aynı yöntem ile kültür ve klinik örneklerden 16S-23S rDNA ITS gen bölgeleri hedef alınarak yapılan bir çalışmada; eş zamanlı olarak, örneklerden birden çok mikobakteri türü tanımlanmış, MTK ve 19 mikobakteri türüne ait algoritma oluşturulmuştur. Bu yöntem, hızlı ve spesifik olmasına rağmen, henüz yeterli sayıda mikobakteri türü ile ilgili bilgiler (algoritma) yayınlanmamıştır (28).

DNA prob teknolojisindeki gelişmeler sonucu üretilen bir prob olan AccuProbe® (Gen-probe, San Diego, Calif. A.B.D.), modern mikrobiyoloji laboratuvarlarına çok büyük katkılar sağlamıştır. Bu proplar, duyarlılık ve özgüllükleri son derece yüksek, hızlı sonuç veren, iyi üremiş kültürlerden tanı süresini kısaltan teknik gelişmelerdir (23,67,78). Dezavantajı, A.B.D.'de sık rastlanan mikobakteri türlerini kapsayan, kısıtlı sayıda probun bulunması ve her prob için ayrı işlemlerin gerekmesidir (30,45,51,71). Son yıllarda DNA prob

teknolojisindeki gelişmeler sonucunda INNO-LiPA MYCOBACTERIA (Innogenetic N.V., Ghent, Belçika) ve GenoType Mykobakterien (Hain lifescience GmbH, Nehren, Almanya) kitleri geliştirilmiştir. Kitlerle klinik örneklerden ve kültürlerden aynı anda MTK üyelerinin dahil olduğu 16 mikobakteri türünün tanımlanabildiği bildirilmiştir (29,30,43,49,51,67,71).

Bu tez çalışmasında; tercih ettiğimiz moleküler yöntem olan PRA yöntemi, mikobakterilerin tanımlanmasında, klinik laboratuvarımız alt yapısına uygun, ek ekipman gerektirmeyen, bilgi ve tecrübelerimizi kullanabileceğimiz, basit, ucuz ve güvenilir bir yöntemdir. PRA yöntemi; *Mycobacterium* cinsine özgül, aynı zamanda mikobakteri türleri arasında değişkenlik gösteren, hedef gen bölgelerinin spesifik primerler kullanılarak çoğaltılması, farklı enzimlerle kesilip incelenmesi prensibine dayanır (5,13,70). Hedef gen bölgesi olarak 16S rRNA, *hsp65*, *rpoB*, 16S-23S rRNA ITS, *dnaJ*, *gyrB* bölgeleri kullanılmıştır (1,8,13,33,65). Bunlar içinde en çok çalışılan ve geliştirilen *hsp65*, *rpoB*, 16S-23S rRNA ITS gen bölgeleridir (8,47,65).

rpoB gen bölgesinin PRA ile incelenmesi sonucu, MTK üyelerinin MOTT üyelerinden ayrımı yapılabilmektedir. *rpoB* gen bölgesinin 50 farklı standart mikobakteri suşunda *MspI* ve *HaeIII* enzimleriyle kesilmesiyle 30'dan fazla mikobakteri türüne ait bant kesimleri tespit edilmiş ve tür tanı cetveli olarak yayınlanmıştır (34,47). Ancak bazı mikobakteri türlerinin tanımlanmasında, üçüncü ve dördüncü enzimlere gerek duyulması nedeniyle zaman ve maliyet unsuru artmıştır. Bu yöntemle, MTK üyelerinin ayrımı yapılamamış, fakat *Sau3AI* enzimi kesimi ile *M.africanum*'un diğer MTK üyelerinden ayrımı yapılabilmektedir (34). Yine hızlı üreyen mikobakteri türlerinden ve önemli nozokomiyal infeksiyon etkenlerinden olan *M.chelonae* ve *M.abscessus* türlerinin ayrımı için ek olarak *BstEII* enzimi kullanılmıştır (33,34). Başka bir çalışmada, *rpoB* gen bölgesinin dört farklı restriksiyon (*HaeIII*, *HindII*, *MvaI*, *AccII*) enzimi ile kesilmesiyle, 49 standart mikobakteri suşunun PRA bant paternleri tanımlanmıştır (33). Bu gen bölgesinin PRA analizi sonucu, insanlarda patojen olan MOTT'ların büyük kısmının ayrımı yapılabilmektedir. Ancak dezavantajı, bu türlerin bazılarının ayrımı için ikiden fazla enzime gereksinim duyulması ve tür tanı cetvelinin yeteri kadar geliştirilmemiş olmasıdır.

PRA yöntemi için en iyi standartize edilmiş gen bölgelerinden biri de 16S-23S rRNA ITS bölgesidir (64). Bu bölgenin PCR ürünlerinin *HaeIII* ve *CfoI* enzimleriyle kesilmesi sonucu 48 tür, 40 subgrup ve dört subtip'e ait bant paternleri elde edilmiştir. Ancak bu

yöntemle de bazı mikobakterilerin; MAK, *M.chelonae* ve *M.abscessus* ayrımı için ek enzimlere (*TagI*, *MspI*, *DdeI*, *Avall*) ihtiyaç duyulmuştur (65).

hsp65 gen bölgesinin PRA yöntemiyle analizi, ilk kez 1991 yılında Plicaytis ve ark.ları tarafından geliştirilmiştir (62). Telenti ve ark.ları, 1993 yılında bu analizde bazı modifikasyonlar yaparak uygulanmışlardır (16). Telenti ve ark.ları çalışmalarında, 33 PRA paterni tanımlamışlar ve bunlardan 19 tanesinin tek bir türe, 14 tanesinin ise beş türe ait olduğunu saptamışlardır (iki tip *M.flavescens*, iki alt tür *M.chelonae*, iki tip *M.kansasii*, beş tip *M.gordonae*, üç alt tür *M.fortuitum*). Telenti ve ark.nın çalışmalarından sonra, yöntemi geliştirmeye yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Taylor ve ark.ları, Telenti ve ark.larının algorimalarına beş yeni PRA paterni eklemişlerdir (70). Bunlardan biri yeni bir tür, beş tanesi de yeni alt türdür. Devallois ve ark.ları, 34 standart mikobakteri türünde 49 farklı patern saptamışlar, bunlardan 25'inin tek bir PRA paterni, dokuzunun ise birden fazla PRA paterni gösterdiğini tespit ederek tanı cetveline yeni tür eklemeleri yapmışlardır (13). 2001 yılında Brunello ve ark.ları 22 yeni tür daha çalışarak tür tanı cetvelini geliştirmişlerdir (8). İnternette <http://www.hospvd.ch:8005/> web sayfasında *hsp65* PRA ile ilgili bilgi ve 70'e yakın mikobakteri türüne ait bant paternleri vardır. *hsp65* gen bölgesinin olumsuz yönlerinden biri, kullanılan Tb11 ve Tb12 primer dizinlerinin mikobakteri dışındaki bazı türlere ait *hsp65* genini de çoğaltmasıdır (33,65).

PRA yönteminde yaşanan en büyük sıkıntılardan birisi, birbirine çok yakın ve sayıda olan (özellikle *HaeIII*) bantların yorumlanmasındaki zorluklardır (13,47,65). Bazı araştırmacılar, 60 bp'nin altındaki DNA bantlarını, primer veya primer-dimer bandı olabileceğinden şüphelendikleri için değerlendirmeye almamışlardır (13). Buna karşın Brunello ve ark.ları ise, bazı mikobakteri tür tanımlamalarını yapabilmek için 60 bp ve altındaki bantları değerlendirmeye almışlardır (8). Bizim çalışmamızda 40 bp büyüklüğündeki bantlar gösterilebilmiş (primer, primer-dimer bantları dahil) olmakla beraber, çalışmada 50 bp altındaki bant paternleri değerlendirme dışı bırakılmıştır. Bu davranış, tür tanımlamamızda değişikliğe ve yetersizliğe yol açmamıştır.

İlk yapılan *hsp65* PRA çalışmalarında, bant büyüklükleri değerlendirilirken bilgisayar desteğinden yararlanılmıştır (62,70). Birçok türün bant uzunluklarının ise gözle değerlendirilebileceği belirtilmektedir (16,70). Devallois ve ark.ları, restriksiyon analizi için çok fazla PCR ürününe ihtiyaç gösteren, *M.kansasii* hariç, test edilen tüm şüphelerde gözle değerlendirmenin yeterli olduğunu bildirmişlerdir (13). Çalışmamızda bant büyüklüklerinin

yorumlanması gözle yapılmış ve büyük zorluklarla karşılaşılmamıştır. Bunun nedeni, sınırlı sayıda ve türde MOTT ile çalışılmış olması olabilir.

Devallois ve ark.ları 100-200 bp arasındaki bantları değerlendirirken bilgisayar desteği gerekebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, yapılan analizlerde primer konsantrasyonunun ve siklus sayısının azaltılmasının, primer bağlanma ısısının 62°C'ye yükseltilmesinin oluşan non-spesifik bantları azaltabileceği ve böylece görsel analizlerdeki doğruluk oranını yükseltebileceği bildirilmiştir (13).

Gözle yapılan değerlendirmelerde, her kesim bölgesi için ayrı moleküler ağırlık standartının bulunmaması, kısa bantları yorumlama zorluğunu ortaya çıkarmıştır. Klasik moleküler ağırlık standartları ile yapılan karşılaştırmalarda, birbirine çok yakın bantların değerlendirilmesinde güçlükler yaşanabilmektedir. Bu güçlüğü aşabilmek amacıyla DioMed tarafından geliştirilmiş olan bir moleküler ağırlık standardı, tüm MOTT türlerinin olası bant şekillerini içermektedir (16). Tez çalışmamızda mikobakterilerin elektroforez aşamasının değerlendirilmesi için DioMed firmasının geliştirdiği, *Bst*EII enzim kesimi için Dio-Myker B[®] ve *Hae*III enzim kesimi Dio-Myker H[®] moleküler ağırlık standartını kullandık ve başarılı sonuçlar elde ettik.

hsp65 PRA yönteminin dezavantajlarından biri, doğrudan klinik örneklerden çalışılmamasıdır (13,70). Mikroskopi pozitif örneklerden çalışıldığına yönelik yayınlar olmasına rağmen (5,27,42), karşılaştırmalı olarak yapılmış pekçok çalışmada doğrudan klinik örnekten çalışılması önerilmemektedir (1,70,77). Brezilya'da 2003 yılında yapılan bir çalışmada, doğrudan klinik örneklerden yapılan *hsp65* PRA incelemelerinde duyarlılığı %25, özgüllüğü %97.5, pozitif prediktif değeri %25 ve negatif prediktif değeri %97.5 olarak bulmuşlar ve testin klinik örneklerden çalışılmasının uygun olmadığı kanaatine varmışlardır (77). Sebep olarak materyallerdeki inhibitör faktörler üzerinde durulmuş, inhibitör faktörleri uzaklaştırmak için yapılan çalışmalardan ise yeterli sonuç alınamamıştır (1,77).

Brunello ve ark.ları, elektroforez aşamasında %3 agaroz jel ile %5 ve %10'luk poliakrilamid jelleri karşılaştırmışlar, %10'luk poliakrilamid jelin özellikle 100 bp'den kısa bantların değerlendirilmesinde daha faydalı olduğunu, %3 agaroz jelde yapılan bant değerlendirmelerinde ise ± 10 bp değişimler olabileceğini bildirmişlerdir (8). Çalışmamızda %12'lik poliakrilamid jel kullanarak 50 bp kadar olan bant uzunluklarını değerlendirmeyi başardık.

hsp65 PRA yöntemi ile MTK üyelerinden sadece *M.canettii*'nin ayrımı yapılabilmış, diğer üyelerin bant uzunluklarının aynı olduğu saptanmıştır (21). Özellikle moleküler ve filogenetik çalışmalarda büyük öneme sahip 16S rRNA dizi analizi ile problemleri olan türlerin tanımlanmasında mükemmel sonuçlar elde edilmiştir (*M.kansasii* ile *M.gastri* ayrımı veya *M.chelonae* ile *M.abscessus* ayrımı gibi) (8,13,53,62,70).

hsp65 PRA yöntemi ile *M.kansasii*, *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.gordonae*, *M.pregrinum*, *M.fortuitum*, *M.simiae*, *M.flavescens* gibi bazı türlerde subgruplandırma yapılmıştır (8,13,70,81). *hsp65* PRA yöntemi ile özellikle *M.kansasii* ve *M.gordonae* için subgruplandırma yapılması, bu yöntemin olumsuz bir yanı olmasına rağmen, yapılan subgruplandırmanın MOTT'ların jeografik dağılımı ve patojenitelerinin belirlenmesi gibi epidemiyolojik veriler açısından yardımcı olabileceği gözardı edilmemelidir (8,65).

Bizim çalışmamızda, 2001 yılındaki izole edilen mikobakterilerin 102 tanesinin MTK üyesi (%98.1), iki tanesinin (%1.9) MOTT üyesi, 2002 yılında ise 63 tanesinin MTK üyesi (%96.97), iki tanesinin (%3.07) MOTT üyesi oldukları saptanmıştır. Uzun ve ark. İstanbul'da yaptıkları çalışmada 346 klinik örneği değerlendirmişlerdir. BACTEC 460 TB sistemi ile LJ besiyerinde pozitif saptadıkları 48 örneğin 42'sinin (%87.5) MTK üyesi, altısının ise MOTT üyesi (%12.5) olduğunu belirtmişler ve MOTT'lar için tür düzeyinde tanımlama yapmamışlardır (74).

Çalışmamızda bahsedilen 2001-2002 yıllarına ait dört MOTT üyesinin tümü *M.gordonae* olarak tanımlanmıştır. Daha önceki yıllara ait MOTT şuşlarından, beş izolatan *M.gordonae* tip 7 (%23.5), toplamda ise 13 izolatan *M.gordonae* (%64.6) olduğu saptanmıştır. Ülkemizde mikobakterilerin PRA yöntemiyle tanımlanmasına yönelik tek yayınlanmış çalışma, Ergin ve ark.larının Hacettepe Üniversitesi'nde yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada, BACTEC 460 TB sistemi ile pozitif saptanmış 102 kültürün 22'sinde (%21.5) MOTT tespit edilmiş, MOTT'lar arasında *M.gordonae* tip 1 dört (%18.2) izolatla ilk, *M.chelonae* ise üç (%13.6) izolatla ikinci sırada yer almıştır. Yine bu çalışmada toplamda *M.gordonae* yedi (%31.8) izolat ile (iki tip 3 ve iki tip 4) ilk sıradadır. Ayrıca enzim kesim paterni daha önceki çalışmalarda bulunmayan üç farklı şuş elde edilmiştir (16).

Toplumda tüberküloz prevalansının bilinmesi kadar, MOTT infeksiyon sıklığının ve etkenlerinin tür düzeyinde bilinmesi de epidemiyolojik açıdan büyük önem taşımaktadır. Mikobakteri infeksiyonlarının yaklaşık %0.5-30'undan MOTT'lar sorumludur (18). Ülkemizde MOTT'larla ilgili epidemiyolojik veriler son derece kısıtlıdır. Engin ve ark.larının

16. YÖREKÖBRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

bulduğu %21.5'lik MOTT görölme oranının, iki yıllık 165 pozitif mikobakteri kültüründeki bizim bulduğumuz %2.4'lük MOTT oranı ile, Uzun ve ark.nın %12.5'lik MOTT oranıyla karşılaştırıldığında Engin ve ark.larının buldukları değeri ülkemiz için yüksek görünmektedir (16,74). Bizim iki yıllık süreçte saptadığımız %2.4'lük MOTT oranı ise düşük olarak değerlendirilebilir. MOTT infeksiyonlarının, en sık altıncı dekatta (AIDS epidemisinden önce) görölmesi ve altta yatan başka bir hastalığın bulunması, değışmez bir kural gibidir (2,18). Çalışmamızda, MOTT izole ettiğimiz hastaların yaş ortalamaları 45.5±13.99, MTK izole edilen hastaların yaş ortalamaları 26.17±13.1, tüm hasta popülasyonumuzun yaş ortalamasının ise 32±12.99 olduğu belirlenmiştir. Ergin ve ark. çalışmalarında tüm hastalarının yaş ortalamalarını 42±2 bulurlarken, MOTT izolatlarının saptadığı kişilerin yaş ortalamalarını ise 49.1±3 olarak tespit etmişlerdir (16). MOTT izole edilen grup ile genel hasta popülasyonunun yaş ortalamaları birbirine yakın olmasına karşın, tüm izolatlar değerlendirildiğinde bizim hasta popülasyonumuzun yaş ortalaması bu çalışmaya katılanlardan düşük bulunmuştur. Bu da, MOTT sayımızın düşük çıkmasına neden olan bir faktör olarak değerlendirilebilir.

Son iki yılda izole ettiğimiz dört MOTT hastasının tümünün poliklinik hastası olması, ulaşılabilen bilgiler ışığında altta yatan bir hastalıklarının olmaması ve tüm hastalardan *M.gordonae* izole edilmesi gibi veriler birlikte değerlendirildiğinde, bu sonuçların kontaminasyon veya yalancı infeksiyon olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Sonuç olarak; MOTT prevalansının düşük olduğu mikobakteriyoloji laboratuvarlarında, özellikle sıvı fazlı hızlı kültür sistemlerinde kord oluşumu değerlendirildikten sonra, PRA gibi moleküler yöntemlerin seçilmesi maliyet ve iş gücünü azaltacaktır. PRA yöntemi, gelişmiş mikobakteriyoloji laboratuvarlarında MOTT'ların tanımlanması için kullanılacak hızlı, kolay uygulanabilen, güvenilir ve tek uygulama ile MTK dahil birçok MOTT türünün tanımlanmasına izin veren bir yöntemdir.

VI-ÖZET

1980'lerin başından itibaren MOTT'ların sebep olduğu hastalıklarda bir artış söz konusudur. Bu mikroorganizmalar immün yetmezlikli ve sağlam kişilerde enfeksiyon oluşturabilmekte ve özellikle AIDS'li hastaların tehdit altında olduğu bilinmektedir. MOTT enfeksiyonlarının insidansının artması ve tedavi stratejileri ile epidemiyolojik belirsizlikler yüzünden klinik açıdan önem kazanmaları nedeniyle, etken mikobakterilerin hızlı ayırımı önemlidir.

Klinik izolatlardan mikobakterilerin saptanması ve tanımlanması, öncelikli olarak kültür ve biyokimyasal testlerle yapılmaktadır. Bu geleneksel testler uzun sürmekte (3-4 hafta), çok fazla iş gücüne mal olmakta, sonuç olarak tüm mikobakteri türlerinin tanısında bazen yetersiz kalmaktadır. Klinik laboratuvarlarda BACTEC 460-TB sistemi gibi sıvı kültür sistemlerinin kullanılması, mikobakterilerin üreme kabiliyetini arttırmıştır. Son yıllarda geliştirilen DNA dizi analizi, PRA, SSCP, DNA prob'ları gibi birçok moleküler yöntem, MOTT'ların katı besiyerlerinde üremelerinden önce, pozitif sıvı besiyerlerinden tanımlanması olanağını sunmuştur.

BACTEC 460-TB sistemi ile tez süresince izole edilen dört MOTT ve daha önceki yıllara ait 13 MOTT suşu PRA yöntemi ile çalışmaya alınmış ve tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır. Laboratuvarımızdaki MOTT prevalansının oldukça düşük olması tüm izole edilen mikobakterilerin PRA yöntemi ile tanımlanması, maliyet ve iş gücünü arttıracaktı. Bu yüzden, MTK ön tanısı için son derece basit, ucuz ve güvenilir bir yöntem olan kord oluşumunun gösterilmesini de çalışmamıza ekledik. Çalışma süresince tüm MTK ve MOTT izolatlarını, kord oluşumu ile doğru olarak tanımladık.

Bu çalışmanın sonunda, 17 izolattan 11'inin *M.gordonae*, birinin *M.abscessus* tip 1, birinin *M.intracellulare* tip 1, birinin *M.nonchromogenicum* tip 2, ikisinin *M.genavense* ve bir izolatin ise *M.thermoresistible* olduğunu saptadık.

Sonuç olarak; PRA yöntemi; gelişmiş mikrobiyoloji laboratuvarlarında MOTT'ların tanımlanmasında kullanılabilecek, hızlı, kolay uygulanabilen, güvenilir ve tek uygulama ile bir çok mikobakteri türünün tanımlanmasına izin veren bir yöntemdir. Diğer taraftan, kord oluşumunun değerlendirilmesinin MOTT prevalansının düşük olduğu laboratuvarlarda, moleküler yöntem seçiminde faydalı olacağı ve maliyeti azaltacağı sonucuna vardık.

VII-SUMMARY

Since the early 1980s there has been an increase in disease caused by MOTT. They affect both immune-competent and immune-compromised persons, and the patients with the human immunodeficiency virus are known to be especially vulnerable. Because of the increasing incidence of MOTT infections and their clinical importance, in terms of strategies for treatment and the epidemiological implications, the rapid differentiation of causative mycobacteria is important.

Identification of clinical isolates of mycobacteria to the species level is primarily based on cultural characteristics and biochemical tests. These conventional tests take several weeks, and sometimes fail to provide precise identification. The use of liquid culture systems like BACTEC 460-TB system in the clinical laboratory improves the ability to detect the growth of mycobacteria. Recently developed molecular methods, such as DNA sequence analysis, PRA, SSCP, and DNA prob tests, offer identification of this MOTT from a positive liquid culture medium prior to detection of growth on solid media.

Previously identified 13 MOTT isolates and 4 MOTT isolates isolated using BACTEC 460 TB during the thesis period were analyzed by PRA method for identification of MOTT subspecies. Due to the low MOTT prevalence in our laboratory, the identification of all mycobacterium by PRA method would increase cost and labor. So, we also added the evaluation of cord formation to our study as a simple, cheap and reliable method for the preliminary diagnosis of MTK. All MTK and MOTT isolates were identified definitely by cord formation in this study.

At the end of this study, we detected 11 of 17 isolates as *M.gordonae*, one as *M.abscessus* type 1, one as *M.intracellulare* type 1, one as *M.nonchromogenicum* type 2, 2 as *M.genavense* and one isolate as *M.thermoresistible*.

As a conclusion, PRA method is a rapid, easy and reliable method that provides detection of multiple subspecies in a single step for identification of MOTTs in developed microbiology laboratories. On the other hand, the evaluation of cord formation is cost-effective in the laboratories with low MOTT prevalence and helpful for the selection of molecular study method.

VIII - KAYNAKLAR

1. Adalgiza da Silva R., Cassiana da Costa L., Helio M.T., Antonio Basilio M., Wim Mayrits D., Philip N.S.: Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* Gene for Rapid Identification of Mycobacteria in Brazil, J. Microbiol. Methods., 37: 223-229, 1999.
2. American Thracic Society, Medical Section of The American Lung Association: Diagnosis and Treatment of Diseases Caused by Nontuberculous Mycobacteria, Am.J. Respir. Crit. Care. Med., 156: S1-S25, 1997
3. Attorri S, Dunbar S, Clarridge III J.E.: Assessment of Morphology for Rapid Presumptive Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii*, J. Clin. Microbiol, 38:1426-1429, 2000.
4. Badak F.Z., Goksel S. Sertoz R., Guzelant A., Kizirgil A. Bilgic A.: Cord Formation in MB/BacT Medium is a Reliable Criterion for Presumptive Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Laboratories with High Prevalance of *Mycobacterium tuberculosis*, J. Clin. Microbiol., 37:4189-4191, 1999.
5. Bahrmand A.R., Bakayeva T.G., and Bakayev V.V.: Use of Restriction Enzyme Analysis of Amplified DNA Coding for the *hsp65* Gene and Polymerase Chain Reaction with Universal Primer for Rapid Differentiation of *Mycobacterium* Species in the Clinical Laboratory, Scand. J. Infect. Dis., 30: 477-480, 1998.
6. Benson, C.A.: Disease Due to the *Mycobacterium avium* Complex in Patient with AIDS : Epidemiology and Clinical Symptoms, Clin. Infect. Dis., 18 (suppl. 3) : 218-222, 1994.
7. Blackwood K.S., He C., Gunton J., Turanne Y.C., Wolfe J., and Kabani M.A.: Evaluation of *recA* Sequences for Identification of *Mycobacterium* Species, J. Clin. Microbiol., 38: 2846-2854, 2000.
8. Brunello F., Ligozzi M., Cristeli E, Bonora S., Tortoli E., and Fontana R.: Identification of 54 Mycobacterial Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* Gene, J. Clin. Microbiol., 39: 2799-2806, 2001.
9. Caviedes L., Lee T.S., Gilman R.H., Sheen P., Spellman E., Lee E.H., Berg D.E, James S.M.: Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures, J. Clin. Microbiol., 38:1203-1208, 2000.

10. Chang C.G., Wang L., Liao C., and Huang S.: Identification of Nontuberculous Mycobacteria Existing in Tap Water by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:3159-61, 2002.
11. Chiao-Tang C., Ling-Yu W., Chen-Yi L., and Shio-Ping H.: Identificational of Nontuberculous Mycobacteria Existing in Tap Water by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 3159-61, 2003.
12. Cloud J.L., Neal H., Rosenbery R., Turenne C.Y., Jama M., Hilyard D.R., Carrol K.C.: Identification of *Mycobacterium* spp. By Using a Commercial 16S rDNA Sequencing Kit and Additional Sequencing Libraries. *J. Clin. Microbiol.*, 40:400, 2002.
13. Devallois A., Goh K.S., and Rastogi N.: Rapid Identification of Mycobacteria to Species Level by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* Gene and Proposition of an Algorithm to Differentiate 34 Mycobacterial Species: *J. Clin. Microbiol.*, 35: 2969-2973, 1997
14. Durmaz R.: Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Rıza Durmaz (Ed), 2nci Baskı, Malatya, 2001, 156-167
15. Ellen J.M., Gwen H., Dennis L., James B., Ann B., Mary F., Michael P.R., Kurd D.A., and Mitchell A.Y.: Nontuberculous Mycobacterial Disease Following Hot Tub Exposure, *Emerg. Infect.Dis.*, 7: 1039-1044, 2001.
16. Ergin M.A., Kocagöz T., Us D., Günalp A.: Polimeraz Zincir reaksiyonu-Restriksiyon Enzim Analizi ile Mikobakterilerin Tür Düzeyinde Tanımlanması, *Mikrobiyol Bült.*, 33: 251-261, 1999
17. Esen N., Moleküler Tanıda Kullanılan Yeni Yöntemler, 4.Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 31 Ekim-2 Kasım 2002, Abant, TÜRKİYE.
18. Falkinham III J.O.: Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clin.Microbiol. Rev.*,9. 177-215, 1996.
19. Fukushima M., Kakinuma K., Hayashi H., Nagai H., Ito K., and Kawaguchi R.: Detection and Identification of *Mycobacterium* Species Isolates by DNA Microarray, *J. Clin. Microbiol.*, 41: 2605-2615, 2003.
20. Gillmann L.M., Gunton J., Turenne C.Y., Wolfe J., and Kabani A.M.: Identification of *Mycobacterium* Species by Multiple-Fluorecence PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene, *J. Clin. Microbiol.*, 39:3085-3091, 2001.

21. Goh K.S., Legrand E., Sola C., and Rostogi N.: Rapid differentiation of “*Mycobacterium canettii*” From Other *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms by PCR-Restriction of the *hsp65* Gene, *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3705-3708, 2001.
22. Good R.C., Shinnick T.M.: *Mycobacterium*, In: Collier L, Balows A, Susman M (eds), Topley and Wilson’s Microbiology and Microbiol Infections, Systematic Bacteriology. 9th ed, New York Oxford Pres Inc., 1998, 549-76.
23. Hanna S and Musser J.M., Molecular Diagnosis of Mycobacteria., *Clin. Chemist.*,47:5 809-14, 2001
24. Hanna S., and Matti K.V.: Diversity of the 32-Kilodalton Protein Gene May Form a Basis for Species Determination of Potentially Pathogenic Mycobacterial species, *J. Clin. Microbiol.*, 35: 769-73, 1997.
25. Heekyung P., Hyunjung J., Cheolmin K., Byungseon C., Chulhun L. Chang, Soon K. Park, and Sundae S.: Detection and Identification of Mycobacteria by Amplification of the Internal Transcribed Specer Regions with Genus-and Species-Specific PCR Primers, *J. Clin. Microbiol.* 38: 4080-85, 2000.
26. Hernandez M.S., Morlock P.G., Butler W.R., Crawford J.T., and Cooksey R.C.: Identification of *Mycobacterium* Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using Fluorescence Capillary Electrophoresis, *J. Clin. Microbiol.*, 37: 3688-3692, 1999
27. Hidaka E., Honda T., Ueno I., Yamasaki Y., Kubo K., and Katsuyama T.: Sensitive Identification of Mycobacterial Species Using PCR-RFLP on Bronchial Washings: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 161: 930-934, 2000.
28. Ivamoto T., Sonobe T., and Hayashi K.: Novel Algorithm Identifies Species in a Polymycobacterial Sample by Fluorescence Capillary Electrophoresis-Based Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis, *J. Clin. Microbiol.*, 40: 4705-4712, 2002
29. Johansen I.S., Lundgren B., Thyssen J.P., Thomsen V.O.: Rapid Differentiation Between Clinically Relevant Mycobacteria in Microscopy Positive Clinical Specimens and Mycobacterial Isolates by Line Probe Assay, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 43: 297-302, 2002.
30. Kaminski D.A., Hardy D.J.: Selective Utilization of DNA Probes for Identification of *Mycobacterium* Species on the Basis of Cord Formation in Primary BACTEC 12B Cultures, *J. Clin. Microbiol.*, 33:1548-1550, 1995.

31. Kasai H., Ezaki T., and Harayama S.: Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria by Their *gyrB* Sequences, J. Clin. Microbiol., 38: 301-308, 2000.
32. Kent B.D., Kubica G.P.: Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, 1-207, 1985.
33. Kim B.J. Lee K.H., Park B.N., Kim S.J., Bai G.H., Kook Y.H.: Differentiation of Mycobacterial Species by PCR-Restriction Analysis of DNA of the RNA Polymerase Gene (*rpo*), J. Clin. Microbiol., 39: 2102, 2001.
34. Kim B.J., Lee S.H., Lyu M., Kim S.J., Bai G.H., Kim S.J., Chae G., Kim E.C., Cha C., and Kook Y.: Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpo*), J. Clin. Microbiol., 37: 1714-1720, 1999.
35. Kısa Ö., Baylan O., Bedir O., Albay A., Doğançlı L.: BACTEC 12B Besiyerinde Kord Oluşumunun *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarının Hızlı Ön Tanısındaki Güvenirliği, Mikrobiyol. Bült., 2003. (Basımda)
36. Kıyan M.: *Mycobactericea*, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, (ed) Ustaçelebi Ş., Güneş Kitabevi, Ankara 1999, 419-457.
37. Kocabaş A., Topçu A., Söyletir G., Doğanay M. (ed), İnfeksiyon Hastalıkları, İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri, 1996, 396-443.
38. Kochi A: The Global Tuberculosis Situation and the New Control Strategy of the World Health Organization. Tubercle., 72:1-6, 1991.
39. Köksal F., Durmaz R. (ed), Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2001: 15-34.
40. Köksal O.K., Aydın M.D., Eraslan S., Bekiroğlu N.: Reliability of cord formation in BACTEC 12B/13A Media for Presumptive Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Laboratories with a High Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis*, Eur. J. Clin. Microbiol.Infect.Dis., 21:314-317, 2002.
41. Köksal O.K.: Kord Oluşturma, BACTEC NAP Testi ve Biyokimyasal İdentifikasyon Yöntemlerinin Karşılaştırması ve İstanbul'da Mikobakteri Suşlarının Türlerine Göre Dağılımı, (Uzmanlık Tezi), İstanbul, 1999
42. Koneman E.W., Allen S.T., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C.: Diagnostic Microbiology 5 th Edition, Philadelphia, J.B.Lippincott 1995, 703-776.

43. Kontos F., Petinaki E., Gitti Z., Costopoulos C., Anagnostou S., Tselentis I., Maniatis AN.: Combined Use of the Fully Automated Bactec MGIT 960 System and a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Routine Detection and Identification of Mycobacteria From Clinical Samples, *J. Microbiol.Methods.*, 52: 137-140, 2003.
44. Le Dantec C., Duguet J.P., Montiel A., Domoutier N., Dubrou S., and Vincet V.: Occurrence of Mycobacteria in Water Treatment Lines and in Water Distribution Systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:5318-5325, 2002.
45. Lebrun L., Gönüllü N., Boutros N., Davoust M., Guilbert M., Ingrand D., Ghnassia JC., Vincent V., Doucet-Populaire F.: Use of INNO-LiPA Assay for Rapid Identification of Mycobacteria, *Diagn. Microbiol. Infect.Dis.*, 46: 151-153, 2003.
46. Leclerc M.C., Haddad N., Moreau R., Thorel M.F.: Molecular Characterization of Environmental *Mycobacterium* Strain by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of *hsp65* and Sequencing of *hsp65* of 16S and ITS1 rDNA, *Res. Microbiol.*, 151: 629-638, 2000.
47. Lee H., Park H.J., Cho S., Bai G., and Kim S.J.: Species Identification of Mycobacteria by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of the *rpoB* Gene, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2966-71, 2000.
48. Legrand E., Goh K.S., Sola C., and Rostogi N.: Description of a Novel *Mycobacterium simiae* Allelic Variant Isolated From Caribbean AIDS Patients by PCR- Restriction Enzyme Analysis and Sequencing of *hsp65* Gene, *Mol and Cel Prob*, 14: 355-363, 2000.
49. Makinen J., Sarkola A., Marjamaki M., Vijanen M.K., and Soini H.: Evaluation of GenoType and LiPA MYCOBACTERIA Assay for Identification of Finnish Mycobacterial Isolates, *J. Clin. Microbiol.*, 40: 3478-3482, 2002.
50. McCarter YS, Ratkiewicz IN, Robinson A. Cord Formation in BACTEC Medium is a Reliable, Rapid Method for Presumptive Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *J. Clin. Microbiol.*, 36:2769-2771, 1998.
51. Mendum T.A., Chilima B.Z., Hirsch P.R.: The PCR Amplification of Nontuberculous Mycobacterial 16S rRNA Sequences From Soil, *FEMS. Microbiol. Lett.*, 185: 189-192, 2000.
52. Michael S.P., and C. Fordham von Rey: Nosocomial Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria, *Clin. Infect. Dis.*, 33:1363-74, 2001.

53. Misael Mondragon-Barreto, Carlos A. Vazquez-Chacon, Candelaria Barron-Rivero, Patricia Acosta-Blanco, Kenneth C., Susana Balandrano: Comparison Among Three Methods for Mycobacteria Identification, *Salud. Publica. de Mexico.*, 42: 484-488, 2000.
54. Morris A.J., Reller L.B.: Reliability of Cord Formation in BACTEC Media for Presumptive Identification of Mycobacteria, *J. Clin. Microbiol.* 31:2533-2534, 1993.
55. Nancimae M., Susan I., and Tim C.: Evaluation of the LIPA Mycobacteria Assay for Identification of Mycobacterial Species from BACTEC 12B Bottles, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 1915-19, 1997.
56. Nelson S.M., Cartwright C.P.: Comparison of Algorithms for Selective use of Nucleic-Acid Probes for Identification of *Mycobacterium tuberculosis* from BACTEC 12B Bottles, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 31:537-541, 1998.
57. Oliveira R.S., Sircili M.P., Ueki S.Y.M., Teles M.A.S., Schnabel B., Briones M.R.S., and Leao S.C.: PCR-Restriction Enzyme Analysis of a Bone Marrow Isolate From a Human Immunodeficiency Virus-Positive Patient Discloses Polyclonal Infection With Two *Mycobacterium avium* Strains, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 4643-4645, 2000.
58. Pai H.H., Chen W.C., and Peng C.F.: Isolation of Nontuberculous Mycobacteria From Hospital Cockroaches (*Periplaneta Americana*), *J. Hosp. Infect.*, 53: 224-228, 2003.
59. Park H., Jang H., Kim C., Chung B., Chang L.C., Park S.K., and 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.*, 38: 4080-4085, 2000.
60. Passquale E., Leonardo A.S., Stanislao S., Paola M. Maria P.L., Massimiliano S., and Stefania Z.: Rapid Identification of Cutaneous Infections by Polymerase Chain Reaction-Restriction Analysis Length Polymorphism of the *hsp65* Gene, *Int. J. Der.*, 40:495-499, 2001.
61. Piersimoni C.: Mycobacterial Terminoloji, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3913, 2000.
62. Plicaytis B.B., Plicaytis B.D., Yakrus M.A., Butler W.R., Woodley W.R., Silcox V.A., and Shinnick T.M. : Differentiation of Slowly Growing *Mycobacterium* Species, Including *Mycobacterium tuberculosis*, by Gene Amplification and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, *J. Clin. Microbiol.*, 30: 1815-1822, 1992.

63. Ringuet H., Akoua-Koffi C., Honore S., Varnerot A., Vincent V., Berche P., Gaillard J.L., and Pierre-Audigier C.: *hsp65* Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria, *J. Clin. Microbiol.*, 37: 852-857, 1999.
64. Roth A., Ficher M., Hamid M.E., Michalke S., Ludwig W., and Mauch H.: Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria Based on 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences, *J. Clin. Microbiol.*, 36: 139-147, 1998.
65. Roth A., Reisch U., Streubel A., Naumann L., Kroppenstend R.M., Habicht M., Ficher M., and Mauch H.: Novel Diagnostic Algorithm for Identification of Mycobacteria Using Genus-Specific Amplification of the 16S-23S rRNA Gene Spacer and Restriction Endonucleases, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 1094-1104, 2000.
66. Sandra C.S., Fionnuala M., Jutamas N., C. Fordham von R., and Robert D.A.: Clinical and Epidemiological Correlates of Genotypes Within the *Mycobacterium avium* Complex Defined by Restriction and Sequence Analysis of *hsp65*, *J. Clin. Microbiol.*, 40: 3374-3380, 2003.
67. Scarparo C., Piccoli P., Rigon A., Ruggiero G., Nista D., and Piersimoni C.: Direct Identification of Mycobacteria from MB/BacT Alert 3D bottles: Comparative Evaluation of Two Commercial Probe Assay, *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3222-3227, 2001
68. Sechi L.A., Dupre I., Sanguinetti M., Fadda G., and Zanetti S.: Simple and Rapid Identification of Different Species of Mycobacteria by PCR, *Mol. and Cel. Prob.*, 13:141-146, 1999.
69. Siddiqi S.H.: Procedure for Primary Isolation of Mycobacteria From Clinical Specimens, pp: II.1-II.13. In: BACTEC TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson Diagnostic Instruments System, Maryland, 1989.
70. Taylor T.B., Patterson C., Hale Y., and Safranek W.W.: Routine Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Mycobacteria Growing in Liquid Media, *J. Clin. Microbiol.*, 35: 79-85, 1997.
71. Tortoli E., Nanetti A., Cichero P., Farina C., Mucignat G., Scarparo C., Bartolini L., Valentini R., Nista D., Gessu G., Tosi C.P., Crovatto M., and Brusarosco G.: Performance Assessment of New Multiplex Probe Assay for Identification of Mycobacteria, *J. Clin. Microbiol.*, 39: 1079-1084, 2001.

72. Turenne C.Y., Tschetter L., Wolfe J., Kabani A.: Necessity of Quality- Controlled 16S rRNA Gene Sequence Databases: Identifying Nontuberculous *Mycobacterium* Species, J. Clin. Microbiol. 39: 3637, 2001.
73. Uzun M, Erturan Z, Anđ Ö.: *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksi Suşlarının Erken Tanısında Kord Oluşumunun Değeri, Klimik Dergisi, 13:27-29. 2000.
74. Uzun M, Kasımoğlu Ö: Tüberküloz Tanısında Ehrlich-Ziehl-Neelsen ve Fluokrom Boyama Yöntemlerinin ve Bactec ve LJ Kültür Yöntemlerinin Sonuçlarının Değeriendirilmesi, Klimik Derg, 10 (8): 621-627, 1997.
75. Uzun M.: Tüberküloz Epidemiyolojisi, Tüberküloz Tanı, Direnç, Tedavi, (Ed).Anđ Ö., Uzun M., İstanbul, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:26, 1996, 1-11.
76. Van Embden J.D.A., K. Kremer, R. Jansen, B.A.M. Van Der Zeijst, and L.M. Schouls : Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria, J. Clin. Microbiol., 182 : 2393-401, 2000.
77. Vanda Dolabela M., Fatıma da Piedade M., Jacyr P., Marines Dalla Vale M. : Reliability of *hsp65*-RFLP Analysis for Identification of *Mycobacterium* Species in Cultured Strains and Clinical Specimens, J. Microbiol. Methods., 49: 295-300, 2002.
78. Wood G.L., Molecular Techniques in Mycobacterial Detection.: Arch. Pathol. Lab. Med., 125:122-26, 2001.
79. Woods G.L., Washington II J.A.: Mycobacteria other than *M.tuberculosis*. Rev. Inf. Dis., 9: 275-94, 1987
80. Yagupsky P.V., Kaminsky D.A., Palmer K.M., Nolte F.S.: Cord Formation in BACTEC 7H12 Medium for Rapid, Presumptive Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex, J. Clin. Microbiol., 28:1451-1453, 1990.
81. Yakrus M.A., Hernandez S.M., Floyd M.M., Sikes D., Butler W.R., and Metchock B.: Comparison of Methods for Identification of *Mycobacterium abscessus* and *M.chelonae* Isolates, J. Clin. Microbiol., 39:4103-10, 2001.
82. Yeboah-Mani D., Yates M.D. and Wilson S.T.: Application of a Simple Multiplex PCR to Aid Routine Work of the Mycobacterium Reference Laboratory, J. Clin. Microbiol., 39: 4166-4168, 2001.

2000 YILINDE KURULAN
DOKÜMANLARIYON KURULU