

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU - RESTRİKSİYON ENZİM
ANALİZİ YÖNTEMİ İLE MİKROBAKTERİLERİN TÜR
DÜZEYİNDE TANIMLANMASI**

M. Alper ERGİN

88888

Hacettepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Mikrobiyoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

Tez Danışmanı
Doç. Dr. A. Dürdal US

ANKARA

1999

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ


Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Doç.Dr.A.Dürdal Us (Hacettepe Üniversitesi)



Üye : Prof.Dr.Ayfer Günalp (Hacettepe Üniversitesi)



Üye : Prof.Dr.Semra Kuştimur (Gazi Üniversitesi)



Üye : Doç.Dr.Ferda Tunçkanat (Hacettepe Üniversitesi)



Üye : Doç.Dr.Tanıl Kocagöz (Hacettepe Üniversitesi)



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr.N.Sezgin İlgı



Enstitü Müdürü

Ö Z E T

Mikobakterileri enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında kullanılan kültür yöntemleri ve biyokimyasal testler uzun sürede sonuç vermekte ve özellikle tüberküloz dışı türlerin kesin olarak tanımlanması çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Mikobakterilerin tür düzeyinde hızlı ve doğru olarak tanımlanması, gerek epidemiyolojik verilerin toplanması gerekse uygun tedavi protokollerinin oluşturulması açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarında klinik örneklerden izole edilen 102 mikobakteri suşu, ortak bir antijen olan 65 kDa'luk ısı şok proteinini (*hsp65*) kodlayan genin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi prensibine dayanan polimeraz zincir reaksiyonu – restriksiyon enzim analizi (PRA) yöntemi ile tiplendirilmiştir. Suşların 80'i (%78.4) *Mycobacterium tuberculosis*, 22'si (%21.5) ise tüberküloz dışı mikobakteri olarak tanımlanmıştır. Tüberküloz dışı mikobakterilerin 4'ü (%18.2) *M.gordonae* I, 3'ü (%13.6) *M.chelonae*, 2'ser adedi (%9.1) *M.gordonae* III, *M.gordonae* IV, *M.avium*, *M.peregrinum* ve 1'er adedi (%4.5) *M.fortuitum*, *M.flavescens*, *M.malmoense*, *M.mucogenicum* olarak tiplendirilmiştir. Ayrıca literatürde bildirilen tür saptama cetvellerinde yer almayan, farklı restriksiyon paterni gösteren 3 farklı tür belirlenmiştir. Tüberküloz dışı mikobakterilerin izole edildiği hastalardan çoğunun alta yatan başka bir hastalığı mevcuttur.

Sonuç olarak, PRA yöntemi klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında hızlı, pratik ve güvenilir bir yöntem olarak görünmektedir.

Anahtar sözcükler: Mikobakteriler, PRA, *hsp65*.

ABSTRACT

Classical laboratory methods based on culture and biochemical tests for the diagnosis of mycobacterial infections, take a long time and frequently fail to produce a precise identification especially for non-tuberculous mycobacteria. Mycobacterial identification to the species level is important for both collecting epidemiologic data and selecting a proper treatment regimen.

In this study, a total of 102 mycobacterial strains isolated from clinical specimens in Hacettepe University Hospital Clinical Pathology Laboratories, were evaluated by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) method, which detects common mycobacterial heat shock protein (*hsp65*). Eighty of 102 strains (78.4%) were identified as *Mycobacterium tuberculosis*, and 22 (21.5%) were identified as non-tuberculous mycobacteria (NTM). Most of the NTM strains have been isolated from patients who have underlying disorders and 4 (18.2%) of them were *M.gordonae* I , 3 (13.6%) were *M.chelonae*, 2 of each (9.1%) were *M.gordonae* III, *M.gordonae* IV, *M.avium*, *M.peregrinum* and one of each (4.5%) were *M.fortuitum*, *M.flavescens*, *M.malmoense*, *M.mucogenicum*. Three strains of NTM that show different restriction patterns from earlier algorithms described in literature, could not be identified.

As a result, PRA seems to be a rapid, practical and safe method for the species level identification of mycobacteria isolated from clinical specimens.

Keywords: Mycobacteria, PRA, *hsp65*.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	SAYFA
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VI
KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikobakterilerin genel yapıları ve üreme özellikleri	3
2.2. Hücre duvarı yapısı	6
2.3. Genom yapısı	7
2.4. Epidemiyoloji	7
2.5. Patogenez ve enfeksiyon tipleri	9
2.6. Laboratuvar tanısı	11
2.7. Tedavi	14
2.8. Korunma	15
GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Bactec 12B sıvı besiyerinden DNA ekstraksiyonu	17
3.2. PCR ile <i>hsp65</i> gen bölgesinin çoğaltılması	19
3.3. PCR çoğaltma ürünlerinin elektroforez ile incelenmesi	20
3.4. Restriksiyon enzim analizi	20
BULGULAR	25
TARTIŞMA	31
SONUÇLAR	37
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	45

KISALTMALAR DİZİNİ

PRA	Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism analysis
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
<i>hsp65</i>	Heat shock protein 65
HIV	Human Immunodeficiency Virus
NAGA	N-asetil glutamik asit
NAMA	N-asetil muramik asit
IS 6110	İnsersiyon sekansı 6110
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
NALC-NaOH	N-asetil-L-Sistein-Sodyum hidroksit
T2H	Thiophene-2-karboksilik hidrazid
¹⁴ C	Karbon 14
CO ₂	Karbondioksit
NAP	p-nitro- α -asetil amino- β -hidroksipropiofenon
BstEII	Bacillus stearothermophilus EII
HaeIII	Haemophilus aegyptius III
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BAL	Bronkoalveolar Lavaj
g	gram
<i>g</i>	gravity
TE	Tris-EDTA
MgCl ₂	Magnezyum klorür
dNTP	deoksi nükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetraasetat

TAE	Tris Asetat EDTA
TBE	Tris Borikasit EDTA
APS	Amonyum persülfat
V	Volt
bp	base pair
ATCC	American Type Culture Collection
NCTC	National Collection Type Cultures
TMC	Trudaeu Mycobacterial Collection
TS	Torasentez Sıvısı
MOTT	Mycobacteria Other Than Tuberculosis



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
4.1.1. Kontrol suşlarının BstEII enzimi ile PRA paternleri	29
4.1.2. Kontrol suşlarının HaeIII enzimi ile PRA paternleri	29
4.2.1. Hastalardan izole edilen suşların BstEII enzimi ile PRA paternleri	30
4.2.2. Hastalardan izole edilen suşların HaeIII enzimi ile PRA paternleri	30



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. Tüberküloz dışı mikobakterilerin sınıflandırılması ve en sık neden oldukları hastalıklar	5
3.1. Enzim kesim paterni çalışılan kontrol suşları	23
3.2. Mikobakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan tür tayin cetveli	24
4.1. Tiplendirilen mikobakteri suşları ve oranları	25
4.2. Mikobakteri suşlarının klinik örneklere göre dağılımı	26
4.3. Tüberküloz dışı mikobakterilerin izole edildiği hastaların özellikleri	27
4.4. Tiplendirilemeyen suşların kesim bölgeleri	28

GİRİŞ

Mikobakteriler insan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturabilen ve aside-dirençli boyanma özelliği gösteren basillerdir. Uzun yıllardan beri insan patojeni olarak bilinen *Mycobacterium tuberculosis*, *M.bovis* ve *M.leprae* türlerinin yanısıra, son yıllarda, özellikle AIDS epidemilerinin gündeme gelmesiyle *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii* ve *M.simiae* gibi diğer bazı tüberküloz dışı fırsatçı mikobakteri türlerinin de hastalık yapabileceği belirlenmiştir (1).

M. tuberculosis tarafından oluşturulan tüberküloz enfeksiyonunun önemi günümüzde artarak devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, dünya üzerinde 20 milyondan fazla tüberkülozlu hasta bulunmakta ve her yıl yaklaşık 3 milyon hasta tüberküloz nedeniyle kaybedilmektedir (2). Dünyadaki tüm ölümlerin %7'sinden ve gelişmekte olan ülkelerdeki önlenebilir erişkin ölümlerinin %26'sından sorumlu olan tüberküloz enfeksiyonu, ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur (3).

Tüberkülozun kontrolünde, izolasyon, tanımlama, tiplendirme ve antibiyotik duyarlılık testlerini gerçekleştiren klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına büyük görev düşmektedir. Ancak, mikobakterilerin izolasyon ve tanımlanmasında kullanılan yöntemlerin zaman alıcı ve

zahmetli olması nedeniyle uygun tedavinin başlanması gecikebilmektedir. Ayrıca, *M.tuberculosis* ve tüberküloz dışı mikobakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavi protokollerinin farklı olması, mikobakterilerin doğru olarak tiplendirilmesinin önemini artırmaktadır. Dolayısıyla son yıllarda hızlı, pratik ve güvenilir metodların geliştirilmesi yönündeki çalışmalar yoğunluk kazanmış ve özellikle moleküler mikrobiyolojik yöntemler uygulamaya girmiştir (1, 4).

Mikobakterilerin kısa sürede tiplendirilmesi amacıyla geliştirilen bir yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu - restriksiyon enzim analizi (Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism Analysis, PRA) yöntemi, tüm mikobakteri türlerinde bulunan 65 kDa'luk ısı şok proteinini (heat shock protein, *hsp65*) kodlayan genin, restriksiyon enzimleri ile kesilmesi prensibine dayanmaktadır (4). Elde edilen sonuçlar, kesim bölgelerine göre oluşturulan bir "tür saptama cetveli" (algoritma) ile değerlendirilmektedir.

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarı Mikrobiyoloji Ünitesinde klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerin PRA yöntemiyle tiplendirilmesi ve böylece enfeksiyon etkeni olan mikobakteri türleri sıklığının belirlenerek, ülkemizin bu konudaki verilerine ışık tutması amacıyla planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Mikobakterilerin genel yapıları ve üreme özellikleri

Mycobacterium genusu, Actinomycetales takımı, Mycobacteriaceae ailesinde yer alır. Bu grubun en önemli özelliği, hücre duvarında yüksek oranda lipid içermesidir. Dolayısıyla anilin boyaları ile boyanmazlar ve asit-alkol ile dekolorizasyona dirençlidirler. Aside-dirençli basiller olarak da anılan mikobakteriler, 0.2-0.6 µm eninde, 1.0-10 µm uzunluğunda, hafif kıvrık morfoloji gösteren, hareketsiz, sporsuz ve aerobik organizmalardır (5).

Mikobakteriler katı besiyerinde R veya S tipi, şeffaf veya opak koloniler oluştururlar, ancak koloni morfolojisi türlere göre değişiklik gösterir. Örneğin, *Mycobacterium tuberculosis* kuru tipte koloni oluştururken, *Mycobacterium avium-kompleks* yumuşak transparan koloniler oluşturmaktadır (5). Mikobakterilerin bölünme süreleri türlere göre farklı olmakla birlikte 2-20 saat arasında değişmektedir. Optimal koşullarda 2 gün-8 hafta arasında görülebilir koloniler oluştururlar. Üreme sürelerine göre mikobakteriler, yavaş üreyen ve hızlı üreyen olmak üzere iki grupta toplanabilirler. Hızlı üreyen türlerde koloni oluşumu 7 günden daha kısa sürede, yavaş üreyen türlerde ise 7 günden uzun sürede olmaktadır (6).

Bazı mikobakteri türleri besiyerine difüze olabilen ve sarıdan turuncuya kadar değişebilen renklere pigment oluştururlar. Pigment oluşturmak için ışığa gereksinim duyanlar fotokromojen, ışıkta veya karanlıkta pigment oluşturanlar ise skotokromojen olarak adlandırılırlar (6).

Üreme için optimal ısı dereceleri de yine türlere göre farklılık göstermekte olup 30-45°C arasında değişmektedir. Bir çok mikobakteri türü nitrojen kaynağı olarak amonyak veya amino asitler, karbon kaynağı olarak gliserol ve ek olarak mineral tuzlar içeren basit besiyerlerinde üreyebilirken, bazıları da hemin ve demir transport bileşikleri içeren zengin besiyerlerine gereksinim duyarlar (5). Buna karşın *M.leprae*'nin in-vitro koşullarda üretilmesi mümkün olmamıştır.

Robert Koch'un tüberküloz basilini bulmasından kısa bir süre sonra *M. tuberculosis*'den farklı mikobakteri türleri belirlenmiştir (7). Tanımlanan yeni türlerin sayılarının artmasıyla, 1959 yılında Runyon tarafından yapılan sınıflama sistemi terkedilerek, "atipik mikobakteriler" terimi yerine, "tüberküloz dışı mikobakteriler" (non-tuberculous mycobacteria) terimi tercih edilmiştir (7). Tüberküloz dışı mikobakteriler, son yıllarda nozokomiyal enfeksiyonlar ve özellikle HIV (human immunodeficiency virüs) enfeksiyonları nedeniyle önem kazanmışlardır.

Mikobakterilerin filogenetik tanımlanması 16S rRNA çalışmalarına dayanmakta olup, bugün için tanımlanmış 71 mikobakteri türü

bulunmaktadır. *M.tuberculosis* kompleks (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.microti*, *M.africanum*) dışındaki türler tüberküloz dışı mikobakteriler olarak isimlendirilmiş olup sınıflandırılmaları ve en sık neden oldukları hastalıklar Çizelge 2.1'de özetlenmiştir (7).

Çizelge 2.1. Tüberküloz dışı mikobakterilerin sınıflandırılması ve en sık neden oldukları hastalıklar

Tür	Oluşturduğu Hastalık
Grup I-Fotokromojenler <i>M.kansasii</i> <i>M.asiaticum</i> <i>M.marinum</i> <i>M.intermedium</i>	Akciğer enfeksiyonu, lenfadenit Akciğer enfeksiyonu Deri ve yumuşak doku enfeksiyonu Akciğer enfeksiyonu
Grup II-Skotokromojenler <i>M.szulgai</i> <i>M.scrofulaceum</i> <i>M.interjectum</i> <i>M.gordonae</i> <i>M.cookii</i> , <i>M.hiberniae</i>	Akciğer enfeksiyonu Lenfadenit, akciğer enfeksiyonu Lenfadenit Patojen değil* Patojen değil*
Grup III-Kromojen olmayanlar <i>M.avium</i> kompleks (<i>M.avium</i> , <i>M.intracellulare</i>) <i>M.celatum</i> <i>M.genavense</i> <i>M.haemophilum</i> <i>M.malmoense</i> <i>M.shimodei</i> <i>M.simiae</i> <i>M.ulcerans</i> <i>M.xenopi</i> <i>M.gastrii</i> , <i>M.terrae</i> kompleks (<i>M.nonchromogenicum</i> , <i>M.terrae</i> , <i>M.triviale</i>)	Akciğer enfeksiyon,yaygın enfeksiyon lenfadenit Akciğer enfeksiyonu, yaygın enfeksiyon İmmünoyetersiz hastalarda deri enfeksiyonu, septik artirit İmmünoyetersiz hastalarda yaygın enfeksiyon Akciğer enfeksiyonu Akciğer enfeksiyonu Akciğer enfeksiyonu Akciğer enfeksiyonu Kronik deri ülserleri Patojen değil*
Grup IV-Hızlı üreyenler <i>M.fortuitum</i> kompleks (<i>M.peregrinum</i> , <i>M.abscessus</i> , <i>M.chelonae</i>) <i>M.flavescens</i> , <i>M.smegmatis</i> , <i>M.neonarum</i> , <i>M.thermoresistibile</i>	Yumuşak doku, kemik hastalığı, akciğer enfeksiyonu Patojen değil *

* Genellikle saprofit fakat klinik hastalık vakaları var.

2.2. Hücre duvarı yapısı

Mikobakteriler, birçok tabakadan oluşan kompleks yapıda bir çeper içermektedir. En içteki tabaka plazma membranıdır. Burada proteinler, fosfotidil-inozitol, mannozidler ve lipoarabinomannan bileşikleri bulunmaktadır. İkinci tabaka peptidoglikan tabakadır. Bu tabaka, tekrarlayan disakkarit üniteleri N-asetil glutamik asit (NAGA), N-asetil muramik asit (NAMA) ve bağlantılı olarak L-alanil-D-izoglutamil-mezodiaminopimeil-D-alanin tetrapeptitlerini içermektedir. Son olarak bakterinin yüzeyi mikoseratlar, kısa zincirli lipidler (açılgliceroller), glikolipidler, peptidoglikolipidler ve hidrofobik mikolik asit tabakasından oluşmaktadır. Porinler ve transport proteinleri de bu tabakada yer almaktadır (8).

Mikobakteri hücre duvarının %60'ını oluşturan lipidler, hidrofobisite, aside dayanıklılık, konak hücre tarafından salgılanan litik enzimlere ve bakterisidal ilaçlara direnç ve hücre içi yaşam gibi özelliklerden sorumludurlar. Lipidler, genellikle uzun zincirli yağ asitleri şeklinde olup, en iyi tanımlananları tüberkülostearik asit ve mikoserozik asittir. Mikobakteriyel mikolik asitler ise, 60-90 karbon atomundan oluşan β -hidroksi yağ asitleridir ve trehaloz gibi karbohidratlarla bağlanarak kord faktör oluşturabilirler. Her mikobakteri türü kendine özgü mikolik asit grubu sentez eder ve bu özellik mikobakteri tür tayininde kullanılmaktadır (8).

Mikobakteri hücre duvarında yer alan ve toksik etkisi olan kord faktör bakterinin virulansında, polisakkaritler çabuk tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarında ve proteinler tüberkülin tipi aşırıduyarlılık reaksiyonlarında rol alırlar (5).

2.3. Genom Yapısı

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, IS 6110 olarak adlandırılan insersiyon dizisi sadece *M. tuberculosis kompleks*'te saptanmıştır ve birçok *M. tuberculosis* suşu bu elemanın 1-20 kopyasını taşıyabilir. IS 6110 dizisi, özellikle epidemiyolojik araştırmalar için kullanılmaktadır (8).

2.4. Epidemiyoloji

Tüberküloz dünyada en yaygın görülen enfeksiyonlardan biridir. Tüm dünyadaki hastaların %95'inin gelişmekte olan ülkelerde olduğu ve bu hastaların %77'sinin de 50 yaşın altında olduğu bildirilmektedir (3). Oysa gelişmiş ülkelerde enfekte bireylerin %80'i 50 yaş ve üzerindedir.

Günümüzde her yıl yaklaşık 8 milyon yeni tüberkülozlu hastanın ortaya çıktığı ve buna göre her gün 9.000 olgunun tüberküloz nedeniyle öldüğü ifade edilmektedir (2).

Gelişmiş ülkelerde 1980 yılından itibaren tüberküloz sorununun alevlenmesinde; göç ve seyahatlerin artışı, HIV enfeksiyonunun yayılışı, sosyoekonomik koşulların bozulması ve kontrol programlarında zayıflamanın ortaya çıkışı gibi faktörler rol oynamaktadır (8).

Ülkemizde de son 10 yıldır tüberkülozlu hasta sayısının büyük boyutlarda olduğunun bilinmesine karşın, yetersiz kayıt-ihbar ve denetleme sistemi nedeniyle kesin rakamlara ulaşılamamaktadır. Elimizdeki veriler Türkiye'de 1982 yılı itibariyle tüberküloz prevalansının binde 3.58, 1992 yılı itibariyle tüberküloz insidansının ise binde 4.29 olduğunu göstermektedir (3).

Hastalık yapma potansiyeli ve halk sağlığı ile yakın ilişkisi nedeniyle en önemli tür olan *M.tuberculosis* için tek kaynak insandır ve bulaşma solunum yoluyla olur. Ancak su, toprak, toz, çeşitli gıda maddeleri, evcil ve yabani hayvanlarda yaygın olarak bulunan tüberküloz dışı mikobakteriler de, oluşturdukları fırsatçı enfeksiyonlar nedeniyle son yıllarda önem kazanmaya başlamışlardır (6). Bu türler, vücut yüzeylerinde kolonize olabildikleri gibi enfeksiyon etkeni olarak da izole edilebilirler.

Tüm mikobakteriyel enfeksiyonların %0.5-30'unun tüberküloz dışı mikobakteriler tarafından oluşturulduğu bildirilmektedir (9).

Tüberküloz dışı mikobakteriler, inhalasyon yoluyla alındıklarında sıklıkla akciğer enfeksiyonları oluşturmaktadırlar (10). AIDS'li hastalarda ise gastrointestinal sistem yoluyla alınan mikobakteriler, lenfatik ve vasküler sisteme ulaşarak bakteriyemi ve yaygın enfeksiyona neden olurlar. AIDS'li hastalardan izole edilen mikobakterilerin % 90'ından fazlası *M.avium* serovar 1, 4 ve 8'dir. Yaygın *M.avium* enfeksiyonu AIDS'li hastaların % 43'ünde görülmektedir (11, 12).

2.5. Patogenez ve enfeksiyon tipleri

Tüberkülozun patogenezi, canlı bir tüberküloz basilinin alveole yerleşmesinden kaviter akciğer tüberkülozu gelişimine kadar, basil ile konak arasındaki bir seri immunolojik reaksiyonun sonucudur (3).

Duyarlı bir kişi tarafından solunan enfekte damlacıklarda bulunan basil, alveollere ulaştıktan sonra alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilir. Konakta oluşan hücresel immunité ve geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonları enfeksiyonun tipini ve prognozunu etkilemektedir (5).

M.tuberculosis enfeksiyonlarının en sık görülen şekli olan akciğer tüberkülozu, kronik inflamasyon, nekroz ve kazeifikasyon ile karakterize, yavaş ilerleyen inflamatuvar bir hastalıktır. En önemli klinik bulgular, öksürük, kilo kaybı, ateş, dispne ve göğüs ağrısıdır. Enfeksiyon sırasında servikal adenit, deri lezyonları, perikardit, sinovya tutulumu ve menenjit görülebilir. Basillerin vücut içi yayılımına bağlı olarak kemik, eklem, böbrek, genital sistem ve gastrointestinal sistem tüberkülozları da ortaya çıkabilmektedir. AIDS'li hastalarda ise enfeksiyon daha hızlı ilerler ve sıklıkla çoklu organ tutulumu vardır (3).

Tüberküloz dışı mikobakterilerin patogeneziyle ilgili bilgilerimiz ise kısıtlıdır. Yapılan hayvan deneylerinde, virulanlarının *M.tuberculosis*'e göre daha az olduğunun gösterilmesine rağmen, oluşturdukları akciğer enfeksiyonu bulguları, klasik akciğer tüberkülozundaki bulgulara benzemektedir. Bronkojenik yayılım ile ortaya çıkan tüberkül, kazeifikasyon, kaviter oluşumlar ve fibrozis ile iyileşme en sık saptanan patolojik görünümlerdir (13).

Akciğerlerin kronik hastalığı, tüberküloz dışı mikobakterilerle en sık görülen enfeksiyon şeklidir ve hastalarda kronik öksürük, balgam, akciğer radyolojik incelemesinde anormallik ve yaymalarda aside-dirençli basil varlığı bulunmaktadır. *M.tuberculosis*'den ayırımları ise ancak kültürde üreme sonrası, biyokimyasal testlerle yapılabilmektedir. Bu tip enfeksiyonlar özellikle, orta ve ileri yaşlarda ve kronik obstrüktif akciğer

hastalığı (KOA), kronik bronşit, bronşiektazi, iyileşmiş veya aktif akciğer tüberkülozu, kistik fibrozis, kanser, aspirasyon pnömonisi ve gastrektomi gibi altta yatan hastalığı olanlarda karşımıza çıkmaktadır. Solunum yollarından en sık izole edilen türler *M.avium*, *M.kansasii*, *M.fortuitum* ve *M.scrofulaceum*'dur (14).

Tüberküloz dışı mikobakteriler tarafından oluşturulan diğer enfeksiyonlar arasında lenfadenit, yumuşak doku enfeksiyonları ve özellikle immün süpresif ve AIDS'li hastalarda görülen yaygın enfeksiyonlar sayılabilir (14). Lenfadenitlerde en sık *M.avium*, travma ve cerrahi sonrası oluşan lokalize abselerde en sık *M.fortuitum* ve yüzme havuzları ve balık tankları ile temas sonucu oluşan kronik granülomlar ve ülserlerde en sık *M.marinum* etken olarak bildirilmektedir (14). AIDS'li hastalarda ise özellikle *M.avium*'a bağlı yaygın enfeksiyonlara rastlanmakta ve kemik iliği tutulumu görülebilmektedir (14, 15). Tüberküloz dışı mikobakteriler ayrıca, kemikler, eklemler, tendon bağları, genitoüriner sistem ve meninkslerde de enfeksiyon oluşturabilirler (16).

2.6. Laboratuvar tanısı

Şüpheli enfeksiyonlardan etken mikobakterilerin üretilmesi ve tanımlanması için 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 enfeksiyonların tanısında değer taşıyabilir (17,18).

Mikobakterilerin laboratuvar tanısında ilk basamak her zaman direk mikroskopik inceleme olmaktadır. Bu amaçla, aside dirençli boyama yöntemlerinden Ziehl-Neelsen (sıcak boya) ve Kinyoun (soğuk boya) yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca örnekler, Fluorochrome boyama yöntemi ile de incelenebilir (19).

Laboratuvara gönderilen idrar, doku ve vücut sıvıları gibi steril örnekler kültür yapılmadan önce herhangi bir işleme alınmazken, diğer bakterilerle kontamine olan balgam örneklerinin dekontamine edilmesi gereklidir. Dekontaminasyon için en sık kullanılan yöntem N-asetil-L-cysteine (NALC) - NaOH yöntemidir (19).

Mikobakterilerin üretilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan besiyerleri, Löweinstein-Jensen ve Middlebrook 7H10 olup, bu besiyerlerinde 7 gün içerisinde koloni oluşturanlar hızlı üreyen mikobakteriler, daha geç sürede koloni oluşturanlar ise yavaş üreyen mikobakteriler olarak değerlendirilir (20).

Kültürde üretilen mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması ise çok sayıda biyokimyasal test ile yapılmaktadır. Bunlar arasında, niasin testi, arilsülfataz, katalaz, pirazinamidaz ve üreaz üretimi, nitrat ve tellürit

redüksiyonu, T2H (Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide) inhibisyonu, Tween 80 hidrolizi ve sodyum klorür tolerans testi sayılabilir (19,20,21,22).

Son yıllarda mikobakterilerin hızlı tanısı ve tiplendirmesi amacıyla bazı yöntemler kullanıma girmiştir. Bunlardan Radyometrik (BACTEC 12B) olarak bilinen yöntemde, besiyeri içinde bulunan ^{14}C ile işaretli palmitik asidin mikobakteri tarafından kullanılması sonucu ortaya çıkan radyoaktif CO_2 gazı düzeyi ölçülür. Ayrıca, kültür ortamına eklenen p-nitro- α -asetil-amino- β -hidroksipropiofenon (NAP) ile *M. tuberculosis* ve *M. bovis*'in diğer mikobakterilerden ayrımı yapılabilir (23). Diğer bir yöntem olan gaz-sıvı kromatografisinde ise, mikolik asitlerin karakterizasyonu mümkün olmaktadır (24,25).

Yapılan çalışmalar, mikobakteri DNA ve rRNA'larını saptamaya yönelik moleküler yöntemlerin tanı ve tiplendirmede oldukça duyarlı, özgül ve pratik olduğunu göstermektedir (26, 27, 28). Bu yöntemler arasında da nükleik asit hibridizasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve PCR-Restriction fragment length polymorphism Analizi (PRA) yer almaktadır.

Bu çalışmada da uyguladığımız PRA yönteminde, bütün mikobakterilerde bulunan "heat-shock protein 65" (*hsp65*) geni, PCR ile çoğaltıldıktan sonra iki ayrı restriksiyon enzimi (BstEII ve HaeIII) ile kesilmekte ve ortaya çıkan parçalar elektroforezde incelenmektedir. Bu

şekilde tüm mikobakterileri tiplendirmek mümkün olmaktadır. Ancak farklı restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı PRA yöntemlerinde, tiplendirme için 3-5 adet farklı enzime gereksinim duyulmaktadır (4,28,29,30).

2.7. Tedavi

Mycobacterium tuberculosis enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek ilaçlar izoniazid, rifampin, pirazinamide, etambutol ve streptomisindir. Direnç veya toksisitenin olduğu durumlarda ikinci seçenek olarak para-aminosalisilik asit, ethionamid, sikloserin, kapreomisin, kanamisin, amikasin, siprofloksasin, ofloksasin, rifabutin gibi antibiyotikler kullanılmaktadır (31).

Son yıllarda, özellikle yetersiz tedavi programlarının uygulandığı gelişmekte olan ülkeler ile HIV epidemilerinin görüldüğü ülkelerde çok ilaca dirençli *M. tuberculosis* enfeksiyonları büyük sorun oluşturmaya başlamıştır. Ülkemizde 1994 yılı itibariyle primer direncin %14-27, sekonder direncin ise %37-66 olduğu belirlenmiştir (3). Dolayısıyla tedavinin antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre yönlendirilmesi, en az 3 ilaç kullanılması ve tedavi şemasının doğru olarak uygulanması gibi önlemlerin alınması zorunludur.

Buna karşın, tüberküloz dışı mikobakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerle ilgili olarak

verilerimiz kısıtlıdır (32). Bu gruptaki mikobakterilerin antibiyotik duyarlılık paternleri ve tedavi rejimleri üreme şekillerine göre değişmektedir. Örneğin; yavaş üreyen mikobakterilerden *M. kansasii* pulmoner enfeksiyonunda izoniazid, rifampin, etambutol üçlü tedavisine alternatif olarak klaritromisin de verilirken, *M.avium* enfeksiyonunda etambutol, rifampisin, amikasin, streptomisin, siprofloksasin, klofazimin, azitromisin, klaritromisin ve rifabutin gibi birçok ilacın kullanılabileceği bildirilmektedir (32,33,34). Buna karşın hızlı üreyen mikobakterilerden *M. fortuitum*, *M.abscessus* ve *M.chelonae* tarafından oluşturulan enfeksiyonlar antitüberküloz ilaçlara cevap vermemektedir. Bu etkenler, amikasin, siprofloksasin, ofloksasin, sülfonamidler, sefoksitin, imipenem, klaritromisin ve doksisisiklin gibi farklı antibiyotik gruplarına duyarlılık göstermektedir (32,35).

2.8. Korunma

Tüberkülozdan korunma çalışmalarında, henüz basil ile karşılaşmamış kişilerin, kaynak olgularla karşılaşma riskinin azaltılması ve canlı atenüe BCG aşısı ile aşılama ilk sırayı almaktadır.

Kontrol programlarının en önemli hedefleri, yüksek tedavi başarı oranına ulaşmak ve olgu bulma çalışmalarını genişletmektir. Zira etkin ve doğru bir tedavi programı, gerek enfeksiyonun kronikleşmesini gerekse dirençli basil taşıyan hastaların eradikasyonunu sağlayabilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar: Bu çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Patoloji Rutin Mikrobiyoloji Laboratuvarında 1997-1999 yılları arasında 102 hasta örneğinden izole edilen mikobakteri suşları dahil edildi. Hastaların 65'i (%63.7) erkek, 37'si (%36.2) kadın olup yaş aralıkları 20-79 yıl (ortalama: 42±2) arasında değişmekteydi. Hastanemizin çeşitli servis ve polikliniklerine başvuran hastaların 84'ü (%82.4) Ankara ve çevre ilçelerinden, 18'i (%17.6) ise farklı illerden (4'ü Zonguldak, 3'ü Kastamonu, 3'ü Çankırı, 2'si Çorum, 2'si Sivas, 2'si Adıyaman, 1'i Nevşehir, 1'i Elazığ) gelmekteydi.

Örnekler: Toplam 102 hastadan alınan örneklerin 58'i balgam, 12'si idrar, 8'i bronkoalveolar lavaj (BAL), 7'si torasentez sıvısı, 5'i püü, 3'ü açlık mide suyu, 3'ü trakeal aspirat ve birer adedi perikardiyal sıvı, asit sıvısı, kemik iliği, abse drenaj sıvısı, eklem sıvısı ve plöral sıvı idi. Bu örneklerin 73'ü Göğüs Hastalıkları ve Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniklerinden, 13'ü Üroloji, Nefroloji ve Dahiliye Poliklinik ve Servislerinden, 7'si Dermatoloji ve Ortopedi Servislerinden ve 9'u Hariç poliklinikleri ve Kadın Doğum Servislerinden gönderilmişti.

Rutin Mikrobiyoloji Laboratuvarında uygulanan yöntemler:

Rutin Laboratuvara tüberküloz şüphesiyle gönderilen örnekler; aside

dirençli basil varlığı yönünden Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyanarak incelenmekte ve kültür için BACTEC radyometrik sistem (Becton-Dickenson, USA) kullanılmaktadır. Bu sistemde üreme saptandığında, üreyen bakterinin *M.tuberculosis* olarak tiplendirilmesi ise konvansiyonel PCR (GenProbe, California, USA) yöntemiyle yapılmaktadır.

Çalışmamızda uygulanan yöntemler: Çalışmamızda, BACTEC sistemi 12B sıvı besiyerinde üreme indeksine göre pozitif bulunan örnekler kullanıldı. Bu örnekler, öncelikle aside-dirençli basil varlığı yönünden Kinyoun boyama yöntemiyle kontrol edildi ve PRA (PCR-Restriction fragment length polymorphism Analizi) yöntemiyle tiplendirilmek üzere çalışmaya alındı. Ayrıca, bu suşların koloni morfolojilerinin belirlenmesi ve daha sonra da saklanması amacıyla Löweinstein-Jensen besiyerine pasajları yapıldı.

3.1. BACTEC 12B sıvı besiyerinden DNA ekstraksiyonu

Bu amaçla, mikobakteri üremesi olan sıvı besiyerlerinden 500 µl hacimde alınan örnekler, plastik mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve aşağıdaki yöntemle DNA ekstraksiyonu yapıldı:

- Tüpler 15.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı atıldı, çökelti üzerine 500 µl Tris-EDTA (etilen diamin tetraasetat) (TE) tamponu eklenerek vortekslendi ve 10 dakika 15.000xg'de santrifüj edildi.
- Üst sıvı atıldı, çökelti üzerine 200 µl TE eklenerek vortekslendi ve 15.000xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı atıldı, çökelti üzerine 200 µl TE eklendi ve vortekslenerek 20 dakika kaynar su banyosunda bekletildi.
- Tekrar vortekslendikten sonra, bakteri DNA'sını içeren üst kısım başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve -20°C'de saklandı.

TE tamponun hazırlanması:

1M Tris stok çözeltisi (pH 8.0) :

Trisbase (Sigma)	121.1 g
Steril distile su	800 ml'ye tamamlandı.

pH, HCl ile ayarlandı.

0.5M EDTA stok çözeltisi (pH 8.0):

EDTA (Sigma)	186.1 g
Steril distile su	800 ml'ye tamamlandı.

pH, NaOH ile ayarlandı.

TE tamponu (pH 8.0):

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

3.2. PCR ile *hsp65* gen bölgesinin çoğaltılması

PCR yöntemi kontaminasyonun önlenmesi için özel kabinde uygulandı ve örnekler, son tepkime karışımı 50 µl olacak şekilde aşağıdaki reaktiflerle hazırlandı:

Apirojen su	27.1 µl
Tampon (10X) (Epicentre)	5.2 µl
Enhancer (10X) (Epicentre)	5.0 µl
MgCl ₂ (25mM) (Epicentre)	2.7 µl
dNTP (karışım) (10mM) (Epicentre)	4 µl
Primer Tb11 (100pM/µl) (Genomed Biotech)	0.5 µl
Primer Tb12 (100pM/µl) (Genomed Biotech)	0.5 µl
Taq polimeraz (5U/µl) (Epicentre)	0.25 µl
Test edilecek örnek DNA'sı	5 µl

Kullanılan Tb11 ve Tb12 primerlerinin dizileri aşağıda gösterildi:

Tb11 ⇒ 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3'

Tb12 ⇒ 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3'

Bu karışım 0.20 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde hazırlandıktan sonra, tüpler "thermocycler"a (MJ Research) yerleştirilerek Mikobakteri tiplendirme PCR programı aşağıdaki gibi uygulandı:

94°C	3 dakika (denatürasyon)	1 döngü
94°C	1 dakika (denatürasyon)	} 44 döngü
58°C	1 dakika (birleşme)	
72°C	1 dakika 30 saniye (polimerizasyon)	
72°C	4 dakika	1 döngü

3.3. PCR çoğaltma ürünlerinin elektroforez ile incelenmesi

PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jelde, 10 V/cm gerilim ile elektroforez tankında TrisAsetat-EDTA (TAE) tamponu içerisinde 20 dakika yürütüldü. Jel, önceden hazırlanmış TAE tamponu içeren etidyum bromür (1 µg/ml) çözeltisinde 15 dakika tutularak boyandı ve ultraviyole ışık kaynağı üzerinde görülen bantlar değerlendirildi. Tüm çalışmalarda pozitif kontrol olarak *M.tuberculosis* H37 Ra suşu, negatif kontrol olarak da ajirojen su kullanıldı. 442 baz çiftlik (bp) büyüklükte çoğaltma ürünü gösteren örnekler tiplendirmede ikinci aşama olan restriksiyon enzim analizine alındı.

% 1.2'lik agaroz jel hazırlanışı (Mini jel için):

Agaroz	0.360 g
TAE (1X)	35 ml

TAE (50X) hazırlanışı:

Trisbase	242 g
Glasiyal asetik asit	57.1 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	100 ml

Deionize su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.4. Restriksiyon Enzim Analizi

Dörtyüzkırkiki baz çiftlik çoğaltma ürünleri restriksiyon enzimleri BstEII ve HaeIII ile enzim kesim bölgelerine bakılmak üzere

değerlendirmeye alındı. Bu amaçla her iki enzim kesimi için aşağıdaki karışımlar ayrı tüplerde hazırlandı.

BstEII enzimi için;

Tampon (10X) (Boehringer)	2.5 µl
BstEII enzim (10U/ml) (Boehringer)	0.5 µl
PCR ürünü	10 µl
Steril distile su	11.5 µl

BstEII enzimi içeren tüpler 60°C'de 1 saat bekletildi.

HaeIII enzimi için;

Tampon (10X)(Sigma)	2.5 µl
HaeIII enzim (10U/ml) (Sigma)	0.5 µl
PCR ürünü	10 µl
Steril distile su	11.5 µl

HaeIII enzimi içeren örnekler 37°C'de 1 saat bekletildi.

Örnekler daha sonra %12'lik poliakrilamid jele yüklendi. Jel elektroforez tankında, Tris Borikası EDTA (TBE)(1X) tamponu içinde 150V gerilim uygulanarak 1 saat yürütüldü.

Poliakrilamid jel hazırlanışı:

Deiyonize su	4.9 ml
5X TBE	2.5 ml
30:1 akrilamid/bisakrilamid	5 ml
Amonyum per sülfat(APS) (%10)	90 µl
Temed	10 µl

TBE (5X) hazırlanışı:

Tris base	54 g
Borik asit	27.5 g
0.5 M EDTA pH 8.0	20 ml
Deionize su ile 1000 ml'ye tamamlandı.	

Akrilamid/bisakrilamid (30:1) hazırlanışı:

Akrilamid	30 g
Bisakrilamid	1 g
Steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.	

Amonyum persülfat (APS) (%10) hazırlanışı:

Amonyum persülfat	1 g
Deionize su ile 10 ml'ye tamamlandı.	

Jel, etidyum bromür çözeltisinde (1µg/ml) 30 dakika boyandıktan sonra ultraviyole ışık kaynağı üzerinde enzim ile kesim bölgelerine göre tür tayini için incelendi. Kesim işleminin istenildiği gibi gerçekleştiğini kontrol etmek amacıyla *M.tuberculosis* H37 Ra suşu her çalışmada kullanıldı. Restriksiyon enzimi kesilme ürün boylarının saptanabilmesi için, ØX174 bakteriyofajının HaeIII enzimi ile kesilmiş DNA'sı molekül ağırlık standardı olarak her elektroforez jeline yüklendi.

Ayrıca, 21 adet ATCC kontrol suşu, hem hasta suşlarını tiplendirmede referans olması hem de çalışma yönteminin uygulanabilirliğinin saptanması amacıyla test edildi (Çizelge 3.1).

Çalışmamızın sonunda mikobakterilerin tiplendirilmesi tür saptama cetveline (algoritma) göre yapıldı (Çizelge 3.2) (4,36,37).

Çizelge 3.1. Enzim kesim paterni çalışılan kontrol suşları.

<i>Tür</i>	<i>Suş</i>
M.tuberculosis H37 Ra	ATCC 25177
M.avium	ATCC 25291
M.intracellulare	ATCC 13950
M.kansasii	ATCC 12478
M.fortuitum	ATCC 6841
M.phlei	ATCC 11758
M.rhodoerous	ATCC 13808
M.smegmatis	ATCC 19420
M.diernhoferi	ATCC 19340
M.parafortuitum	ATCC 19686
M.chitae	NCTC 10485
M.duvalii	NCTC 358
M.chubuense	ATCC 27278
M.aichiense	ATCC 27280
M.tokaiense	NCTC 10821
M.gadium	ATCC 27726
M.rhodesiae	NCTC 10779
M.austroafricanum	ATCC 33464
M.gallinarum	ATCC 19710
M.triviale	ATCC 23292
M.senegalense	TMC 806

ATCC: American Type Culture Collection
NCTC: National Collection of Type Cultures
TMC: Trudeau Mycobacterial Collection

Çizelge 3.2. Mikobakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan tür saptama cetveli*.

BstEII	HaeIII	Mikobakteri türü
No digestion/442 →	190/80/60	<i>M.gadium</i>
	180/140	<i>M.triviale</i>
	175/85/65	<i>M.vaccae</i>
	175/85/60	<i>M.gallinarum</i>
	160/80/60	<i>M.parafortuitum</i>
	150/130	<i>M.lentiflavum I</i>
	140/105/70	<i>M.szulgai</i>
	140/80/70	<i>M.duvalii</i>
	140	<i>M.flavescens I</i>
325/140 →	210	<i>M.chelonae I</i>
	200/70/60	<i>M.aichiense</i>
	175	<i>M.haemophilum</i>
	160/70	<i>M.immunogen I</i>
	155/85	<i>M.mucogenicum I</i>
325/115 →	190/140	<i>M.terrae</i>
	190/140	<i>M.diemhoferi</i>
	180/150	<i>M.neoaurum/M.aurum II</i>
	175/120/60	<i>M.rhodesiae</i>
	155/85	<i>M.mucogenicum III</i>
	155/85/60	<i>M.chitae</i>
	150/130	<i>M.lentiflavum II</i>
	150	<i>M.engbackii</i>
	140/115/65	<i>M.gordonae IV</i>
	140/105	<i>M.genavense</i>
	140/100/80	<i>M.kansasii V</i>
	140/65/60	<i>M.chelonae II</i>
245/220 →	210/70	<i>M.abscessus II</i>
	200/135	<i>M.simiae</i>
	200/115/80	<i>M.ulcerans</i>
	190/150	<i>M.falax</i>
	180/60/55	<i>M.austroafricanum</i>
	175	<i>M.scotochromogen</i>
	160/115/80	<i>M.marinum</i>
	160/70	<i>M.abscessus I</i>
	155/150/100	<i>M.peregrinum I</i>
	155/150/50	<i>M.scrofulaceum</i>
	155/140	<i>M.simiae II</i>
	150/135/100	<i>M.peregrinum II</i>
	150/125/100	<i>M.porcinum</i>
	150/100	<i>M.flavescens II</i>
	150/80	<i>M.phlei</i>
	150/80/60	<i>M.chubuense</i>
140/115	<i>M.gordonae IV</i>	
140/105/60	<i>M.avium</i>	
140/75/60	<i>M.celatum</i>	
115/110	<i>M.asiaticum</i>	
245/140/85 →	175/80	<i>M.aurum I</i>
	160/130/60	<i>M.smegmatis</i>
	155/150/100	<i>M.peregrinum II</i>
	150/110/70	<i>M.shimodei</i>
	150/80/60	<i>M.tokaiense</i>
	145/85/60	<i>M.agri</i>
	140/120/95	<i>M.gordonae IV</i>
	140/105/70	<i>M.gastri</i>
	140/105	<i>M.kansasii II</i>
245/115/100 →	170/115	<i>M.gordonae VII</i>
	155/140/60	<i>M.intracellulare</i>
	155/110/70	<i>M.malmoense</i>
	150/135	<i>M.lentiflavum III</i>
	150/65	<i>M.hibernae</i>
	140/120	<i>M.gordonae III</i>
245/115/80 →	235/115	<i>M.gordonae II</i>
	200/150	<i>M.senegalense</i>
	170/115/60	<i>M.gordonae I</i>
	170/105/60	<i>M.xenopi</i>
	160/140/70	<i>M.tuberculosis complex</i>
	160	<i>M.nonchromogenicum I</i>
	155/135	<i>M.fortuitum I</i>
	150/135/60/55	<i>M.fortuitum II</i>
140/115/70	<i>M.kansasii IV</i>	

* Kaynak 4, 36 ve 37'den birleştirilerek modifiye edilmiştir.

BULGULAR

Tiplendirmeye alınan 102 adet mikobakteri suşunun, 65'i (%63.7) erkek, 37'si (%36.2) kadın hastalardan izole edilmiştir. Bu hastaların yaş aralığı 20-79 yıl, yaş ortalaması ise 42±2 yıl olarak belirlenmiştir. Çalışılan suşların tamamı hastanemiz rutin mikrobiyoloji laboratuvarında yapılan BACTEC 12B kültür sisteminde üretilmiş, 69'u (%67.6) direk mikroskopik inceleme ile 80'i (%78.4) ise GenProbe PCR yöntemiyle pozitif olarak bulunmuştur.

Tiplendirme sonunda mikobakterilerin 80'i (%78.4) *Mycobacterium tuberculosis*, 22'si (%21.5) tüberküloz dışı mikobakteri olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Tiplendirilen mikobakteri suşları ve oranları.

Suş	Sayı	Yüzde
<i>M.tuberculosis</i>	80	78.4
<i>M.chelonae</i>	3	2.9
<i>M.gordonae I</i>	4	3.9
<i>M.gordonae III</i>	2	1.9
<i>M.gordonae IV</i>	2	1.9
<i>M.avium</i>	2	1.9
<i>M.peregrinum</i>	2	1.9
<i>M.fortuitum</i>	1	0.9
<i>M.flavescens</i>	1	0.9
<i>M.malmoense</i>	1	0.9
<i>M.mucogenicum</i>	1	0.9
Farklı patern*	3	2.9
TOPLAM	102	100.0

* : Restriksiyon kesim paterni mevcut şemalarda yer almadığı için tiplendirilemeyen

Tiplendirilen mikobakteri suşlarının izole edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı Çizelge 4.2'de görülmektedir.

Çizelge 4.2. Mikobakteri suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı.

	<i>Balgam</i>	<i>BAL</i>	<i>İdrar</i>	<i>Tora-sentez</i>	<i>Asit sıvısı</i>	<i>Diğer*</i>	<i>Toplam</i>
<i>M.tuberculosis</i>	48	6	6	4		16	80
<i>M.chelonae</i>				2	1		3
<i>M.gordonae I</i>	3		1				4
<i>M.gordonae III</i>	1		1				2
<i>M.gordonae IV</i>	1		1				2
<i>M.avium</i>	2						2
<i>M.peregrinum</i>	1		1				2
<i>M.fortuitum</i>			1				1
<i>M.flavescens</i>		1					1
<i>M.malmoense</i>	1						1
<i>M.mucogenicum</i>			1				1
<i>Farklı patern</i>	1	1		1			3
<i>Toplam</i>	58	8	12	7	1	16	102

* : Püy (5), trakeal aspirat (3), açlık mide suyu (3), perikardiyal sıvı (1), kemik iliği (1), abse drenaj (1), eklem sıvısı (1), plöral sıvı (1).

M.tuberculosis olarak tiplendirilen mikobakterilerin 27'si (%33.7) kadın, 53'ü (%66.2) erkek hastalardan izole edilmiş olup, bu hastaların yaş ortalamaları 38±2 yıldır. *M.tuberculosis* izole edilen balgam, BAL, trakeal aspirat, torasentez, perikardiyal ve plöral sıvı örnekleri (63/80, %78.7) Göğüs Hastalıkları ve Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniklerinden, idrar örnekleri (6/80, %7.5) Üroloji, Nefroloji ve Dahiliye Poliklinik ve Servislerinden, püy, eklem sıvısı ve abse drenaj örnekleri (7/80, %8.7) Dermatoloji ve Ortopedi Servislerinden, diğer örnekler (4/80, %5.0) ise Hariç Polikliniklerinden gönderilmiş örneklerdir. Tüberküloz dışı

mikobakteri suşlarının izole edildiği hastalarla ilgili bilgiler ise Çizelge 4.3'de görülmektedir.

Çizelge 4.3. Tüberküloz dışı mikobakterilerin izole edildiği hastaların özellikleri.

Yaş/Cins	Mikobakteri türü	Örnek	Klinik tanı	Geldiği Bölüm
62/ K	M.chelonae	TS**	Perikardiyal efüzyon	Dahiliye Serv.
53/K	M.chelonae	TS**	Akc. adeno ca.	Enfek.Hast. Serv.
28/ K	M.chelonae	Asit sıvısı	Uterus ca.	Kadın Doğ. Serv.
21/ E	M.gordonae I	Balgam	Sinüzit, Akc. tbc?	Göğüs Hast. Plk.
79/ K	M.gordonae I	Balgam	Kro. Sol. Yetm.	Enfek. Hast.Serv.
58/E	M.gordonae I	Balgam	Kro. Sol. Yetm.	Hariç Plk.
64/E	M.gordonae I	İdrar	Kro. Böb. Yetm.	Nefroloji Plk.
48/ E	M.gordonae III	Balgam	Kronik bronşit	Göğüs Hast. Plk.
25/E	M.gordonae III	İdrar	Kro. Böb. Yetm.	Hariç Plk.
54/ K	M.gordonae IV	İdrar	Kro. Böb. Yetm.	Romatoloji Plk.
51/ E	M.gordonae IV	Balgam	KOAH	Göğüs Hast. Plk.
39/ E	M.avium	Balgam	AIDS	Enfek.Hast. Serv
61/ K	M.avium	Balgam	AIDS	Enfek. Hast. Plk.
33/K	M.peregrinum	İdrar	Kro. Böb. Yetm.	Hariç Plk.
48/K	M.peregrinum	Balgam	Akc. tbc?	Dahiliye Plk.
26/K	M.fortuitum	İdrar	AIDS	Enfek.Hast.Serv.
71/ E	M.flavescens	BAL**	Akc. ca., tbc?	Dahiliye Serv.
62/ E	M.malmoense	Balgam	Kro. Akc. Hast.	Göğüs Hast.Plk.
46/K	M.mucogenicum	İdrar	Kro. Böb. Yet.	Üroloji Plk.
66/ E	Farklı patern*	Balgam	KOAH	Göğüs Hast.Plk.
38/E	Farklı patern*	TS**	KOAH	Dahiliye Plk.
48/ E	Farklı patern*	BAL**	Akc. ca? Tbc?	Hariç Plk.

* : Restriksiyon kesim paterni mevcut şemalarda yer almadığı için tiplendirilemeyen

** : TS: Torasentez sıvısı, BAL: Bronkoalveolar lavaj, KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı.

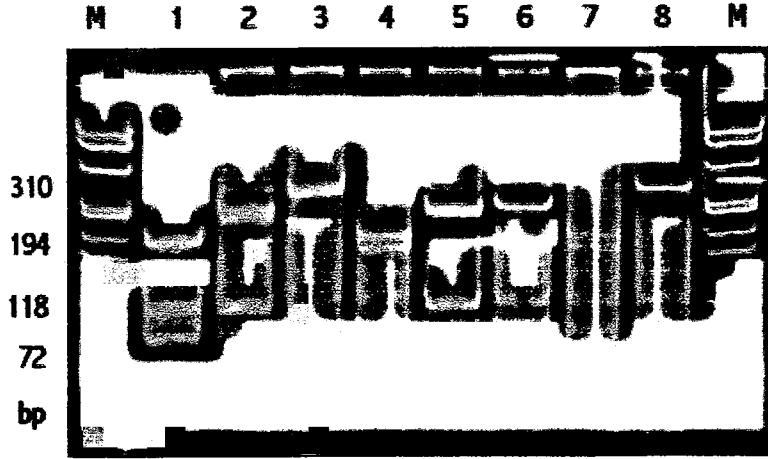
Tür saptama cetvelinde HaeIII enzimi kesim paterni bulunmadığı için tiplendirilemeyen 3 tüberküloz dışı mikobakteri suşunun çalışmamızda elde edilen kesim bölgeleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Tiplendirilemeyen suşların kesim bölgeleri.

Suş No.	BstEII (bp)	HaeIII (bp)
1	442	155/100/80/60
2	325/140	155/110/90
3	325/115	145/120/80

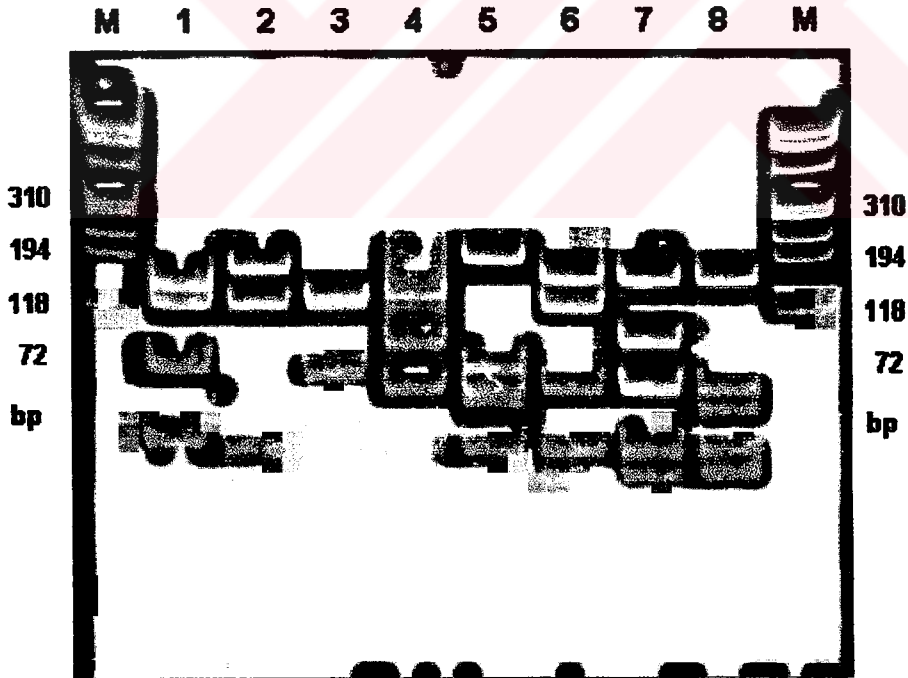
Çalışılan 21 adet kontrol suşundan rastgele seçilmiş 8'inin BstEII ve HaeIII enzimleri ile kesim paternleri görüntülenmiş ve Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir. Aynı şekilde 6 hastaya ait mikobakteri türünün restriksiyon enzim paternleri de Şekil 4.2.1 ve 4.2.2'de görülmektedir.

Şekil 4.1.1. Kontrol suşlarının BstEII enzimi ile PRA paternleri.



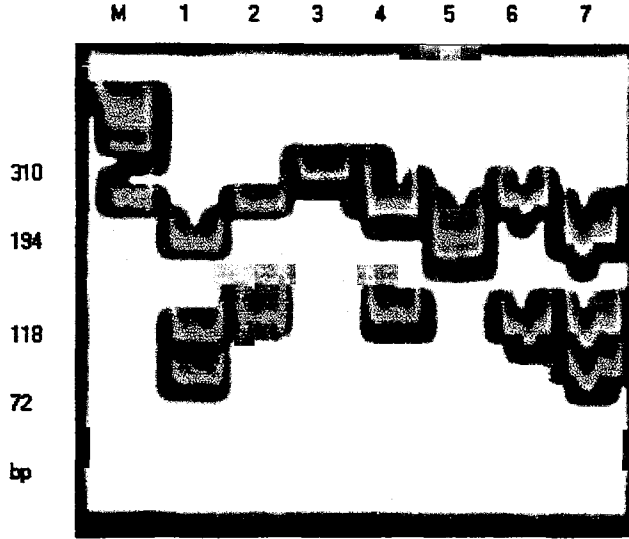
M: Moleküler ağırlık standardı (ϕ X174) 1. *M.tuberculosis* H37Ra, 2. *M.diernhoferi*, 3. *M.duvalii*, 4. *M.chubuense*, 5. *M.aichiense*, 6. *M.rhodesiae*, 7. *M.austroafricanum*, 8. *M.gallinarum*.

Şekil 4.1.2. Kontrol suşlarının HaeIII enzimi ile PRA paternleri.



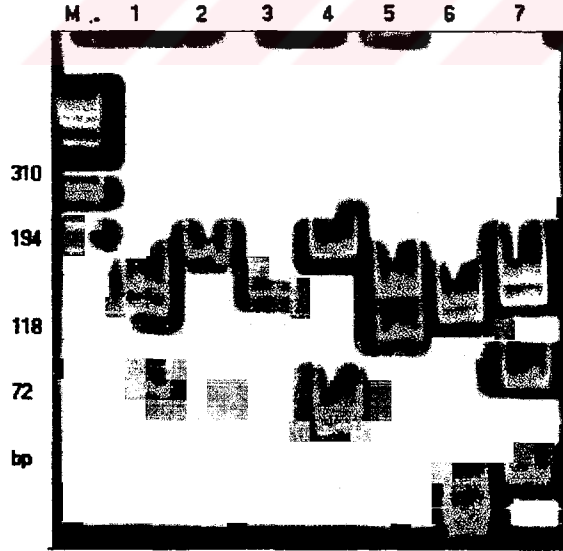
M: Moleküler ağırlık standardı (ϕ X174) 1. *M.tuberculosis* H37Ra, 2. *M.diernhoferi*, 3. *M.duvalii*, 4. *M.chubuense*, 5. *M.aichiense*, 6. *M.rhodesiae*, 7. *M.austroafricanum*, 8. *M.gallinarum*.

Şekil 4.2.1. Hastalardan izole edilen suşların BstEII enzimi ile PRA paternleri.



M:Moleküler ağırlık standardı (ϕ X174), 1.*M.tuberculosis* H37Ra 2.*M.chelonae* I, 3.Tiplendirilemeyen suş, 4.*M.chelonae* I, 5.*M.peregrinum*, 6.Tiplendirilemeyen suş, 7.*M.tuberculosis*.

Şekil 4.2.2. Hastalardan izole edilen suşların HaeIII enzimi ile PRA paternleri.



M:Moleküler ağırlık standardı (ϕ X174), 1.*M.tuberculosis* H37Ra 2.*M.chelonae* I, 3.Tiplendirilemeyen suş, 4.*M.chelonae* I, 5.*M.peregrinum*, 6.Tiplendirilemeyen suş, 7.*M.tuberculosis*.

TARTIŞMA

Günümüzde tüberküloz enfeksiyonu insidansının hızla artması ve çoklu ilaç direnci gösteren *M.tuberculosis* suşlarının ortaya çıkması, klinik öneme sahip mikobakterilerin izolasyon ve tanımlamasında hızlı ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi gereksinimini doğurmuştur. Aynı şekilde AIDS epidemileri ve immun sistemi baskılayan tedavilerin yaygın kullanımı gibi nedenler de, tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonlarında dikkati çeken bir artışa neden olmuştur. Dolayısıyla, enfeksiyon etkeni olarak izole edilen mikobakteri suşlarının tür düzeyinde tanımlanması, gerek uygun tedavi protokollerini oluşturmak gerekse epidemiyolojik veriler açısından önem taşımaktadır. Bu amaçla son yıllarda, mikobakterilerin tür tayini için hızlı, güvenilir ve ucuz teknikler üzerindeki çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (37, 38, 39).

Mikobakteri enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı, hasta örneğinin aside dirençli boyama yöntemiyle direk mikroskopik incelemesi, kültürü ve izole edilen suşun biyokimyasal testlerle tiplendirilmesi ile PCR yöntemlerine dayanmaktadır. Kültür yöntemlerinin uzun sürede sonuç vermesi, biyokimyasal testlerin ise zahmetli ve zaman alıcı olması nedeniyle mikobakterilerin tanımlanması ve uygun tedaviye başlanması gecikmektedir. Ayrıca, tüberküloz dışı mikobakteri türlerinin bazen

biyokimyasal olarak değişkenlik gösterebilmesi de doğru tiplendirmeyi zorlaştırmaktadır.

Bu alışmada, BACTEC 12B kültür sistemi ile klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerin, PRA (PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis) yöntemiyle tiplendirilmesi amaçlanmış ve hastanemizde ilk kez uygulanan bu yöntemle özellikle tüberküloz dışı mikobakterilerin sıklığının belirlenmesi mümkün olmuştur.

Çalışmamızda, PRA yönteminin tercih edilmesi; hızlı ve biyokimyasal testlere göre nispeten kolay uygulanabilir bir yöntem olması, diğer moleküler metodlardan farklı olarak tüm mikobakterilerde ortak olan *hsp65* geninin amplifikasyonuna dayanması ve kullanılan BstEII ve HaeIII enzimlerinin mikobakteri tiplendirmesinde doğru sonuçlar verdiğinin gösterilmiş olması gibi nedenlerden dolaydır (39).

İlk kez Telenti ve arkadaşları tarafından geliştirilen PRA yöntemi, sunulan çalışmada bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır (4). Bu araştırmacılar, enzim ile kesim uygulaması sırasında NuSieve agaroz jeli kullandıkları halde, bizim çalışmamızda poliakrilamid jel kullanılmıştır. Böylece küçük parçalar dahil olmak üzere bütün kesim paternleri rahatlıkla ayırd edilebilmiştir.

Telenti'nin çalışmasından sonra, yöntemi geliştirmeye yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Devallois ve arkadaşları, 34 standart mikobakteri türünde 49 farklı patern saptamışlar, bunlardan 25'inin tek bir PRA paterni, 9'unun ise birden fazla PRA paterni gösterdiğini tespit ederek tanı cetveline yeni tür eklemeleri yapmışlardır (37). Çalışmamızda da *M.tuberculosis* H37 Ra suşu dahil olmak üzere 21 ayrı standart ATCC suşu kullanılmış, ancak bu tanı cetvelinde yer almayan farklı restriksiyon kesim paternine sahip 3 adet suş elde edilmiştir (Şekil 4.1, 4.2).

Hızlı ve güvenilir bir tiplendirme yöntemi olarak kabul edilen PRA yönteminin bazı dezavantajları da mevcuttur. Örneğin bu yöntem henüz doğrudan hasta örneklerine uygulanamamakta ve ancak, katı yada sıvı besiyerlerinde üretilen suşların tiplendirilmesi yapılabilmektedir. Bu araştırmada PRA yöntemi, BACTEC 12B sıvı besiyerinde üreyen mikobakteriler kullanılarak uygulanmıştır. PRA tekniğinin diğer sıkıntıları ise, her kesim bölgesi için ayrı bir moleküler ağırlık standardının bulunmaması ve küçük restriksiyon kesim ürünlerini yorumlama zorluğudur. Örneğin bazı araştırmacılar, 60 baz çiftinden küçük bantların değerlendirme dışı bırakılmasını savunurken, bazıları da 50 baz çiftinden büyük olan bantları değerlendirmektedirler (40,41). Bu sorunun çözümü, *hsp65* geni DNA dizisinin saptanmasıyla tür tayini yapılmasına dayanmaktadır (42). DNA dizi analizi çalışmalarıyla tıbbi önemi olan mikobakterilerin alt gruplarına kadar tiplendirilmesi mümkün olacaktır

(43,44). Çalışmamızda ise, 50 baz çiftinden büyük bandların değerlendirilmesi mümkün olmuştur.

PRA yönteminin uygulanmasıyla, çalışmaya aldığımız 102 mikobakteri pozitif kültür örneğinin 80'inden (%78.4) *M.tuberculosis*, 22'sinden (%21.5) ise tüberküloz dışı mikobakteri türleri tanımlanmıştır. Tüberküloz dışı mikobakteri türleri arasında *M.gordonae* 1, 4 izolatla (%18.2) ilk sırayı alırken *M.chelonae* 3 izolatla (%13.6) onu izlemiştir. Ayrıca, enzim kesim paterni daha önceki çalışmalarda yer almayan 3 farklı suş daha elde edilmiştir (Çizelge 4.4). Çalışmamızda tiplendirilen 80 adet *M.tuberculosis* suşunun hepsi rutin laboratuvarında uygulanan GenProb PCR yöntemi ile de aynı şekilde tanımlanmıştır. GenProb PCR ile negatif bulunduğu için "tüberküloz dışı mikobakteri" olarak tür adı verilmeden rapor edilen 22 örneğin tiplendirilmesi, uyguladığımız PRA yöntemiyle mümkün olmuştur.

Huang ve arkadaşlarının Tayvan'da yaptıkları çalışmada, 15 referans suşun yanında, klinik örneklerden izole edilen 50 mikobakteri suşu ile BACTEC 12B sıvı besiyerinden elde edilen 108 suş PRA yöntemiyle tiplendirilmiştir (45). Bu araştırmada, *M.tuberculosis* suşlarının 15'i ve diğer mikobakteri (*Mycobacteria other than tuberculosis*, MOTT) suşlarının 81'i BACTEC sistemiyle aynı sonuçları verirken, 4 adet *M.tuberculosis* suşu ile 3 adet MOTT suşu sadece PRA yöntemiyle saptanabilmiş ve tüberküloz dışı mikobakterilerden en sık izole edilen

türün *M.fortuitum* olduğu ifade edilmiştir. Cormican ve arkadaşları tarafından İrlanda'da yapılan çalışmada da, 53 adet farklı mikobakteri izolatu PRA yöntemi ile tanımlanmış ve bu yöntemin hızlı ve kontamine kültürlerde de başarıyla uygulanabilir olduğu kanısına varılmıştır (46).

Ülkemizde, mikobakterilerin PRA yöntemiyle tiplendirmesine yönelik yayınlanmış bir çalışmaya rastlanamamıştır. Ancak, Uzun ve arkadaşları İstanbul'da yaptıkları çalışmalarında, 346 klinik örneği değerlendirmişler, BACTEC ve Löwenstein-Jensen besiyerlerinde üretilen 48 örneğin 42'sini (%87.5) *M.tuberculosis* kompleks, 6'sını ise (%12.5) MOTT olarak tanımlamışlardır (47). Çalışmada tüberküloz dışı mikobakteriler için tür tayini yapılmamıştır. Karabay ve arkadaşları tarafından Trakya Üniversitesi'nde yapılan çalışmada da, 11 kontrol mikobakteri suşu ve 88 klinik izolat nitrat indirgeme testi ile denenmiş, klinik izolatların 83'ü *M.tuberculosis*, ikisi *M.gordonae*, birer tanesi ise *M.fortuitum*, *M.phlei* ve *M.bovis* olarak tanımlanmıştır (48).

Toplumlarda, tüberküloz enfeksiyonu prevalansının bilinmesi kadar, tüberküloz dışı mikobakteriyel enfeksiyon sıklığının ve etkenlerinin tür düzeyinde bilinmesi de epidemiyolojik değer taşımaktadır (49). Mikobakteri enfeksiyonlarının yaklaşık %0.5-%30'undan tüberküloz dışı mikobakteriler sorumlu tutulmaktadır (9). Çalışmamızda izole edilen mikobakteriler arasında *M.tuberculosis*'in en yüksek orana (%78.4) sahip olması doğaldır. Ancak tüberküloz dışı mikobakterilerin izolasyon oranı

(%21.5) yüksek görünmektedir. Hastalarımızın hemen hepsinde altta yatan hastalıkların olması (kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kronik solunum veya böbrek yetmezliği, kanser ve AIDS), yaş ortalamalarının yüksek olması (49±2 yıl) ve hastanemize farklı coğrafik bölgelerden (Ankara ve çevresi, Çorum, Çankırı, Zonguldak, Sivas, Elazığ) başvurmuş olmaları bu oranı etkilemiş olabilir.

Çalışmamızda tüberküloz dışı mikobakteri türleri, en sık balgam (10/22, %45.4) ve idrar (6/22, %27.2) örneklerinden tanımlanmıştır. Bu bulgular, balgam ve idrar örneklerinde sıklıkla karşımıza çıkan *M.tuberculosis* ile tüberküloz dışı mikobakteri türleri arasındaki ayrımın doğru olarak yapılmasının, tedaviyi yönlendirmesi açısından büyük önemi olduğunu vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, gerek epidemiyolojik verilerin toplanması gerekse uygun tedavinin yapılması açısından, klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerin doğru olarak tiplendirilmesi amacıyla PRA yönteminin güvenle kullanılabileceği belirlenmiştir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1) Klinik örneklerden izole edilen 102 mikobakteri suşu PRA yöntemiyle tiplendirilmiş ve 80'i (%78.4) *M.tuberculosis*, 22'si (%21.5) tüberküloz dışı mikobakteri olarak saptanmıştır. Tüberküloz dışı mikobakteri türleri en sık balgam (%45.4) ve idrar (%27.2) örneklerinden tanımlanmıştır.

2) *M.tuberculosis* izole edilen hastaların 27'si (%33.7) kadın, 53'ü (%66.2) erkek olup, yaş ortalamaları 38 ± 2 yıl, tüberküloz dışı mikobakteri izole edilen hastaların ise 10'u (%45.4) kadın, 12'si (%54.5) erkek olup, yaş ortalamaları 49 ± 2 yıldır.

3) Tüberküloz dışı mikobakteri türleri arasında *M.gordonae* I, 4 izolatla (%18.2) ilk sırayı alırken, *M.chelonae* 3 izolatla (%13.6) onu izlemiştir. *M.gordonae* III, *M.gordonae* IV, *M.avium*, *M.peregrinum* türleri 2'şer (%9.1) ve *M.fortuitum*, *M.flavescens*, *M.malmoense*, *M.mucogenicum* türleri de 1'er (%4.5) örnekten tanımlanmıştır. Ayrıca, enzim kesim paterni literatürdeki tür saptama cetvellerinde yer almayan 3 farklı suş elde edilmiştir.

4) Tüberküloz dışı mikobakteri izole edilen hastaların hemen hepsinin KOAH, kronik solunum veya böbrek yetmezliği, kanser ve AIDS gibi altta yatan hastalıkları olduğu belirlenmiştir.

5) Klinik örneklerden izole edilen mikobakteri suşlarının hızlı ve doğru tiplendirilmesinde PRA yönteminin pratik ve güvenilir bir test olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kirschner P, Meier A, Böttger EC: Genotypic identification and detection of mycobacteria, p. 173-190. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology. 1993, ASM, Washington DC.
2. Kochi A: The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercle 1991, 72: 1-6.
3. Kocabaş A: Akciğer tüberkülozu, s. 396-443. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (ed), İnfeksiyon Hastalıkları. 1996, Nobel Kitabevleri, İstanbul.
4. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993, 31(2): 175-78.
5. Haas DW, DesPrez RM: Mycobacterium tuberculosis, p. 2213-43. In: Mandell, Bennett, Dolin (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases, Vol 2. 1995, 4th ed, Churcill Livingstone, New York.
6. Woods GL, Washington II JA: Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis. Rev Inf Dis 1987, 9(2): 275-94.
7. Aygen B, Doğanay M: Akciğerin tüberküloz dışı mikobakteri infeksiyonları, s. 443-48. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (ed), İnfeksiyon Hastalıkları. 1996, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

8. Good RC, Shinnick TM: Mycobacterium, p. 549-76. In: Collier L, Balows A, Sussman M (eds), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology. 1998, 9th ed, Oxford Press Inc, New York.
9. Falkinham III JO: Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996, 9(2): 177-215.
10. Brooks RW, Parker BC, Gruft H, et al: Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1984, 130: 630-33.
11. Collins CH, Grange JM, Yates MD: Mycobacteria in water. J Appl Bacteriol 1984, 57:193-121.
12. Reyn von Fordham C, Waddell RD, Eaton T, et al: Isolation of Mycobacterium avium complex from water in the United States, Finland, Zaire and Kenya. J Clin Microbiol 1993, 31(12): 3227-30.
13. French AL, Benator DA, Gordin FM: Nontuberculous mycobacterial infections. Med Clin North America 1997, 81(2):361-79.
14. O'Brien RJ, Cohn DL: Nontuberculous mycobacterial disease, p. 805-21. In: Evans AS, Brachman PS (eds), Bacterial Infections of Humans. Epidemiology and Control. 1998, 3rd ed, Plenum Med Book Company, New York.
15. Guthertz LS, Damsker B, Bottone EJ, et al: Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare infections in patients with and without AIDS. J Infect Dis 1989, 160(6): 1037-41.

16. Hornick DB, Schlesinger LS: Mycobacterioses other than tuberculosis, p. 419-37. In: Collier L, Balows A, Sussman M (eds), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Bacterial Infections. 1998, 9th ed, Oxford University Press, New York.
17. Wolinsky E: Mycobacteria, p. 647-64. In: Davis, Dulbecco (eds), Microbiology. 1990, 4th ed, Lippincott Company, Philadelphia.
18. Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al: Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: Report of a 2 year experience in a clinical laboratory. J Clin Microbiol 1993, 31(11): 2882-89.
19. Nolte FS, Metchock B: Mycobacterium, p. 400-37. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Microbiology. 1995, 6th ed, ASM Press, Washington DC.
20. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: Mycobacteria, p. 893-952. Diagnostic Microbiology. 1997, 5th ed, Lippincott Company, Philadelphia.
21. Berlin GW: Mycobacteria, p. 597-640. In: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 1990, 8th ed, Mosby Company, St Louis.
22. Picardeau M, Prod'homme G, Raskine L, et al: Genotypic characterization of five subspecies of Mycobacterium kansasii. J Clin Microbiol 1997, 35(1): 25-32.
23. Siddiqui SH, Libonati JP, Middlebrook G: Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 1981, 13: 908.

24. Butler WR, Jost KC, Kilburn JO: Identification of mycobacteria by high performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 29: 2468-72.
25. Springer B, Wu WK, Bodmer T, et al: Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: Description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *J Clin Microbiol* 1996, 34(5): 1100-1107.
26. Ellner PD, Kiehn TE, Cammarata R, Hosmer M: Rapid detection of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol* 1988, 26: 1349.
27. Kocagöz T: Yeni laboratuvar teknikleri ile tüberküloz tanısı. *İnfeksiyon Dergisi* 1997, 11(4) Suppl: S29-33.
28. Olive DM, Bean P: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999, 37(6): 1661-69.
29. Schinnick T: The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 1987, 169: 1080-88.
30. Eriks IS, Munck KT, Besser TE, et al: Rapid differentiation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* by PCR and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1996, 34(3): 734-37.
31. Grange JM: Tuberculosis, p. 392-413. In: Collier L, Balows A, Sussman M (eds), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 1998, 9th ed, Oxford University Press, New York.

32. American Thoracic Society: Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156: S1-25.
33. Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LM: The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev* 1993, 6(3): 266-310.
34. Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, et al: Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium fortuitum*. *J Clin Microbiol* 1999, 37(6):1676-1682.
35. Dabbs ER, Katsukiyo Y, Mikami Y, et al: Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation. *Antimicrob Agent Chemother* 1995, 39(4): 1007-9.
36. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW: Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol* 1997, 35(1):79-85.
37. Devallois A, Goh KS, 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* 1997, 35(11): 2969-73.
38. Springer B, Stockman L, Teschner K, et al: Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996, 34(2): 296-303.

39. Rastogi N, Goh KS, Berchel M: Species-specific identification of *Mycobacterium leprae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. *J Clin Microbiol* 1999, 37(6): 2016-19.
40. Wilson RW, Steingrube VA, Brown BA, et al: Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic actinomycete isolates. *J Clin Microbiol* 1998, 36(1): 148-52.
41. Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, et al: PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1995, 33(1): 149-53.
42. Pai S, Esen N, Pan X, et al: Routine rapid mycobacterium species assignment based on species-specific allelic variation in the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65). *Arch Pathol Lab Med* 1997, 121: 859-64.
43. Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S: hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999, 37(3): 852-57.
44. Tötsch M, Brömmelkamp E, Stücker A, et al: Identification of mycobacteria to the species level by automated restriction enzyme fragment length polymorphism analysis. *Virchows Arch* 1995, 427: 85-89.
45. Huang T, Liu Y, Huang W, et al: Evaluation of polymerase chain reaction restriction enzyme analysis of mycobacteria cultured in BACTEC 12B bottles. *J Formos Med Assoc* 1996, 95(7): 530-34.

46. Cormican MG, Glennon M, Riain UN, Flynn J: Evaluation of a PCR based method for identification of mycobacterial isolates. Irish J Med Sci 1995, 164(1): 20-23.
47. Uzun M, Kasımoğlu Ö: Tüberküloz tanısında Ehrlich-Ziehl-Neelsen ve fluokrom boyama yöntemlerinin ve Bactec ve Löweinstein-Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. Klimik Derg 1997, 10(1): 36-40.
48. Karabay O, Otkun M, Akata F, Tuğrul M: Mycobacterium ayırımında kullanılan nitrat indirgeme testi için kristal ayıraçlı bir yöntem önerisi. İnfeksiyon Dergisi 1997, 11(3): 197-99.
49. Shih J, Hsueh P, Lee L, et al: Nontuberculous mycobacteria isolates: Clinical significance and disease spectrum. J Formos Med Assoc 1997, 96(8): 621-27.

Ö Z G E Ç M İ Ş

- Adı Soyadı : M.Alper Ergin
- Doğum Yeri : Ankara
- Doğum Tarihi : 10 Ağustos 1968
- İlk öğrenim : Namık Kemal İlkokulu (1974-1979)
- Orta öğrenim : TED Ankara Koleji (1979-1983)
- Lise öğrenimi : TED Ankara Koleji (1983-1986)
- Yüksek öğrenim : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü (1986-1990)
- Yüksek lisans : Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (1991-1993)
- Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (1993-)
- Mesleki deneyim: 1991 yılından beri Hacettepe Üniversitesi ,
Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
Araştırma görevlisi.
- Üyesi olduğu bilimsel dernekler: Ankara Mikrobiyoloji Derneği
American Society for Microbiology
Türk Mikrobiyoloji Derneği