

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

MYCOBACTERIUM TÜRLERİNİN *hsp65* ve *gyrB* GEN BÖLGELERİNİN
DİZİ ANALİZİ İLE TANIMLANMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. AYSUN KAYA

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEVGİ TÜRET

ANKARA 2007

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında emeği geçen değerli danışmanım Prof. Dr. Sevgi Türet'e, uzmanlaşma sürecimde bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Nedim Sultan'a, Prof. Dr. Turgut İmir' e, Prof. Dr. Semra Kuştimur' a, Prof. Dr. Seyyal Rota' ya, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Meltem Yalınay ırak' a ve her konuda yardımcı olan Öğretim Görevlisi Dr. Doruk Engin'e, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve zor anlarımda hep yanımda olan canım aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	3
GİRİŞ	5
GENEL BİLGİLER	7
GEREÇ VE YÖNTEM	34
BULGULAR	44
TARTIŞMA VE SONUÇ	49
ÖZET	62
SUMMARY	64
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	76

KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	Acquired Immunodeficiency sendrom
ddNTP	dideoksi nükleotit trifosfat
dNTP	deoksi nükleotit trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
E-MTD	Amplified <i>M. tuberculosis</i> Direct test
GLC	Gas-liquid chromatography
<i>gyrB</i>	DNA gyrase sub-unit B
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPLC	High-performance liquid chromatography
<i>hsp65</i>	65-kDa heat shock protein gene
IS	Insertion sequences
ITS	Internal transcribed spacer
MAC	<i>Mycobacterium avium intracellulare</i> kompleks
MTK	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NTM	Nontuberculous mycobacteria
PCR	Polimerase chain reaction
PPD	Purified protein derivative
PRA	PCR Restriction endonuclease analyses
RD	Region differences gene

RFLP	Restriction length polymorphism analyses
<i>rpoB</i>	RNA polymerase subunit B
SSCP	Single stranded conformation polymorphism analyses
TLC	Thin-layer chromatography

GİRİŞ

Tüberküloz tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen önemini korumaya devam etmektedir. Bugün sadece az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin değil, gelişmiş ülkelerin de en büyük sorunlarından birisini oluşturan tüberküloz bütün dünyada yaygın olarak görülmekte ve önemini korumaktadır. Türkiye’de de aynı şekilde son yıllarda hasta sayısı artmaya devam etmektedir.

Tüberküloz basilinin kısa sürede tanımlanması ve enfeksiyon kaynağının belirlenmesi etkin bir tedavi için çok önemlidir. Tüberküloz tanısında ilk basamak aside dirençli boyama yöntemlerinin uygulanmasıdır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basil görülmesinden sonra klinik ve radyolojik bulgular da tüberküloz tanısını desteklemektesyse, genellikle tüberküloz tedavisine hemen başlanmaktadır. Daha sonraki süreçte elde edilen kültür, tanımlama ve duyarlılık test sonuçları verilen tedavinin daha etkin kılınmasını sağlamaktadır. Ancak *M. tuberculosis*’ in tüberküloz dışı mikobakterilerden (Non-tuberculous mycobacteria-NTM, mycobacteria other than *M. tuberculosis*-MOTT) mikroskopik inceleme ile ayırt edilmesi mümkün olmadığından MOTT ile enfekte hastalarda tedavi etkisiz kalabilmektedir. MOTT türlerinin büyük çoğunluğu klasik antitüberküloz ilaçlara dirençlidir. Bu durumda hem hastaya yararı olmayan bir ilacın gereksiz kullanılması, hem de hastanede kalış süresinin uzaması önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle tedaviye başlamadan önce mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Mikobakteri türlerinin tanımlanması amacıyla kullanılan klasik yöntemler zaman alıcı, uygulanması zor olan yöntemlerdir ve ancak belli mikobakteri türlerinin birbirlerinden ayırtedilmesini sağlayabilmektedir. Ayrıca kesin tanımlama yapılabilmesi için bu testlerin

hepsinin uygulanması gerekmektedir ve tüm mikobakteri izolatlarının %14' ü fenotipik yöntemlerle tanımlanamamaktadır.

Mikobakterilerin tanımlamasındaki gelişmelere bakıldığında, 1980'li yıllara kadar fenotipik testlerin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Daha sonraki süreçte ise moleküler yöntemlerdeki ilerlemelerin etkisiyle genotipik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Günümüzde ise moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Mikobakterilerin tanımlanmasında dizi analizi yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir.

Çalışmamızda üreme zamanı, koloni morfolojisi ve pigment üretimi değerlendirilerek ve anahtar test olarak niasin testi ile ön tanımlanması yapılan 64 mikobakteri suşunun, *hsp65* ve *gyrB* dizi analizi ile kompleks ve tür seviyesinde tanımlanması, türlere göre dağılımının saptanması, bu yöntemin laboratuvarımızda rutin kullanıma uygunluğunun saptanması ve toplumumuzdaki mikobakteri tür dağılımı ile ilgili çalışmalara zemin oluşturulması amaçlanmıştır.

1 GENEL BİLGİLER

Tüberküloz insanlık tarihinin en eski ve en çok korkulan hastalıklarından birisidir. İnsanların tüberküloz basili ile ilk karşılaşmasının sosyal yaşama geçtiği milattan önce 8000 yıllarında olduğu tahmin edilmektedir. Son zamanlara kadar *M. tuberculosis*' in *M. bovis*' in genetik değişikliklere uğraması sonucunda, hayvanların evcilleştirildiği dönemde insanda hastalığa yol açtığı görüşü benimsenmiştir (16). Ancak günümüzde *M. tuberculosis* kompleksinde yer alan bakterilerin moleküler epidemiyolojik çalışmalarında sağlanan bilgiler, bu görüşün değişmesine sebep olmuştur. Yeni bilgi ve bulgular, *M. tuberculosis* kompleksinin atasının *M. prototuberculosis* olduğunu, ilk atadan delesyonel mutasyonlarla gelişen konak spesifik fenotipik değişimlerin sanıldığı gibi 15-35 yıl önce değil, 3 milyon yıl önce şekillenmeye başladığını göstermiştir (28, 39).

1.1 Epidemiyoloji

Tüberküloz hala tüm dünyanın en önemli sağlık sorunlarından birisidir. (79).Gelişmiş birçok ülkede 1985 yılından itibaren tüberkülozlu hasta sayısı tekrar artışa geçmiştir (23). Dünyada tüberküloz artışında dört önemli neden sıralanmıştır: Hükümetlerin hastalığı ihmal etmeleri sonucunda tüberküloz kontrol sistemleri kötüleşmiş ve hatta birçok yerde kaybolmuştur; kötü yönetilen ya da doğru yaklaşımların uygulanmadığı tüberküloz kontrol programları hastalığın artışı yanında ilaca dirençli tüberkülozun artışına yol açmıştır; tüberküloz ve “Human Immunodeficiency Virus” (HIV) ile birlikte olduğu hallerde, HIV’in endemik olduğu yerlerde tüberküloz patlayıcı artış yapmıştır; nüfus artışı tüberküloz olgularının sayılarında artışa yol açmıştır (78). Sanayileşmiş ülkelerde ise göçlerle gelen tüberküloz olguları, o ülkelerde artış nedenlerinden birisini oluşturmuştur (17,29).

Her yeni enfeksiyon, dünya nüfusunun %1' nin enfeksiyonu ile sonuçlanan ikinci bir enfeksiyona neden olmaktadır. Tüberküloz epidemisi yayılmaktadır. Her yıl yaklaşık 2 milyon insanın ölümüne sebep olmaktadır. 2000-2002 yıllarında yeni kazanılan enfeksiyonların 1 milyar olacağı tahmin edilmektedir (80).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Küresel Tüberküloz Kontrolü 2002 raporunda, 2000 yılında dünyada kayıtlı tüberkülozlu yeni hasta sayısının 3.671.973, bunların 1.529.806'sının yayma pozitif olduğu belirtilmektedir. Tahmin edilen yeni hasta sayıları ise toplam 8.74 milyon, yeni yayma pozitif olgu sayısı 3.84 milyondur. Dünyada tüberküloz insidansı 1998 yılında 144/100.000, yayma pozitif tüberküloz insidansı ise 63/100.000'dir (78). Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı verilerine göre 2000 yılında ülkemizde 18.038 yeni tüberküloz olgusu belirlenmiş ve tüberküloz insidansı 27/100 000 olarak belirtilmiştir (50).

Sanayileşmiş ülkelerde son 10 yıl içinde tüberküloz kontrolü çabaları sonuç vermiş ve hasta sayılarında yeniden düşüş eğilimi görülmüştür (17).

Tanı konulan her dört hastadan birisinin ölüyor olması, dünyada tüberküloz hastalarının yeterince tedavi edilmediklerini açık bir şekilde göstermektedir. Tüberküloz ölümlerinin hemen tümü, önlenabilir ölümlerdir (50).

1.1.1 Mycobacterium ile HIV koenfeksiyonunun etkisi

Dünyanın belli bölgelerinde büyük oranda kontrol edilemeyen HIV pandemisi tüberkülozun yayılmasına önemli oranda neden olmuştur. HIV enfeksiyonu ve tüberküloz, moleküler düzeyden epidemiyolojiye kadar her seviyede sinerjistik hastalıklardır. Örneğin HIV varlığı tüberküloz basilinin hücre içi replikasyonunu artırır ve böylece *M. tuberculosis*'in diğerlerine bulaşmasını kolaylaştırır. Dünyanın bazı bölgelerinde tüberküloz, HIV ile enfekte kişilerde ölümün önde gelen nedenlerindendir. HIV ile enfekte 36.1 milyon kişinin üçte birinin aynı

zamanda tüberküloz enfeksiyonu olduğu DSÖ tarafından saptanmıştır. Latent tüberkülozun bilinen en güçlü risk faktörü, HIV ile koenfeksiyondur (37, 63).

1.2 Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Mycobacterium cinsi, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin yüksek G+C içerikli gram pozitif bakterilerin sınıflandırılmasında, 16S rDNA dizilimlerinin baz alındığı ikinci baskısında *Corynebacterium* ve *Nocardia* ile birlikte *Actinomycetales* takımında sınıflandırılmış olup *Mycobacteriaceae* ailesinde yer alan tek cinstir (43).

Mycobacterium cinsi içerisindeki türlerin klinik öneminin tarihsel süreçteki değişimi, bu cins içindeki türlerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında farklı araştırmacılar tarafından değişik yöntemlerin kullanılmasına neden olmuştur. Mikobakteriler genel olarak hızlı ve yavaş üreyenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. 1950' lerin sonuna doğru, Ernest Runyon, *M. tuberculosis* ve *M. bovis* dışındaki mikobakterileri, üreme hızlarını, pigment üretimlerini ve koloni morfolojilerini temel alarak, fotokromojenler, skotokromojenler, nonfotokromojenler ve hızlı üreyenler olarak 4 grupta sınıflandırmıştır (60). Bu sınıflandırma uzun yıllar mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmıştır (65). Ancak daha sonraları tıbbi önem kazanan bazı türlerin Runyon sınıflamasına göre tanımlanmasında bazı güçlüklerle karşılaşmıştır. Örneğin klinik önemi son yıllarda ortaya çıkan *M. kansasii*, genellikle fotokromojenik olmakla birlikte, bazı suşlarının pigment oluşturmaması ve hatta skotokromojenik olması, Runyon sınıflamasına göre hangi grupta yer alacağı konusunda tartışma yaratmaktadır. Runyon'un sınıflamasının günümüzde klinik önemi olan tüm mikobakterilerin sınıflandırılmasındaki bu kısıtlamalara rağmen, halen klinik mikrobiyoloji laboratuvarları, MOTT türlerinin ön tanımlanmasında bu sınıflamadan yararlanmaktadır (37).

Günümüzde yapılan DNA hibridizasyon çalışmaları ile bazı mikobakteriler arasında DNA homolojisinin %85-100 oranında değiştiği belirlenmiş, *M. tuberculosis* ile *M. bovis* türleri arasında %100 benzerlik olduğu ortaya konmuştur. Restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan deneylerde de benzer sonuçlar alınmıştır. *M. tuberculosis* ve benzer bakteriler *M. tuberculosis* kompleksi (MTK) adı altında toplanmıştır (8, 26,35).

M. tuberculosis kompleksten farklı olan mikobakteriler ise atipik mikobakteri, *M. tuberculosis* kompleks dışı mikobakteriler, tüberküloz dışı mikobakteri gibi çeşitli isimlerle anılmaktadır (10, 5).

Mikobakterilerin hücre yapısı ve genetiği ile ilgili bilgilerimizin artışıyla yeni klinik önem kazanan mikobakterileri içine alan bir sınıflandırma, 1987’ de Woods ve Washington tarafından önerilmiştir (6).

1.3 Morfoloji

Mikobakteriler aerop, sporsuz, hareketsiz, 0.2-0.6 µm en ve 1-10 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Lipitten zengin hücre duvarına sahip olmaları nedeniyle gram boya ile iyi boyanmazlar. Yine aynı nedenle hücre duvarını geçen boyanın uzaklaştırılması da zordur (34). Dekolorizasyon (renksizleştirme işlemi) diğer bakterilerde de alkolle yapılırken mikobakterilerde asit alkolle yapılır. Asit kullanılmasına rağmen ilk boyayı bırakmazlar. Bu nedenle aside dirençli bakteriler olarak anılırlar. (35,37).

M. tuberculosis kompleks üyeleri hücre duvar yapısında bulunan trehaloz-6-6’-dimikolat (kord faktörü) maddesi varlığına bağlı olarak sıvı besiyerinde uzun kordonlar oluşturur. Virülan olmayanlarda ve MOTT’da ise görülmez (40).

1.4 Kültür zellikleri

Genel olarak ilk izolasyonda çoğu tür 37°C’de iyi rer. Ancak optimal sıcaklık bazı türlerde (*M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. haemophilum*) 30-32°C, bazılarında (*M. xenopi*) 42°C’dir. Koloni morfolojisi türler arasında büyük değişiklikler gösterir. S tipinde (*M. avium intracellulare*), R tipinde (*M. tuberculosis*) veya ikisinin arasında olabilir. Koloniden etrafa doğru yayılmış dallanan, filamentöz yapılar görülebilir (*M. xenopi*). Bazı türler mikroaerofilik şartlarda daha iyi rerken bazıları düşük oksijen konsantrasyonlarına tahammül edemez. Genus içerisinde pigment oluşturan (kromojen) ve pigment oluşturmayan (nonkromojen) bakteriler vardır. Pigment bazen sadece ışıklı ortamda (fotokromojen) bazen de hem ışıklı, hem karanlık ortamda (skotokromojen) olabilir. Mikobakterilerin reme süreleri türden türe değişiklik gösterir. Genel olarak patojen olanların ikiye bölünme zamanı daha uzun, üreme sıcaklıkları daha sınırlı ve asit-alkole dirençleri daha fazladır (35).

1.4.1 Mikobakteriyoloji laboratuvarı organizasyonu ve işlevi

M. tuberculosis’ in primer izolasyonunda hem sıvı hem katı besiyeri kullanmalı, 24 saat içinde ARB sonucunu rapor etmeli, basil izolasyonunu 14 günde, tanımlamasını 24 günde tamamlamalı ve duyarlılık test sonuçlarını 28 günde rapor etmelidir (27).

Tüberküloz kontrolünün önemli bir kısmı laboratuvara bağlıdır. Potansiyel olarak enfeksiyöz aerosoller mikobakteriyoloji laboratuvarında en önemli tehlikedir. Bu nedenle enfekte materyalle çalışmalarda aerosol oluşumuna yol açabilecek tüm uygulamalar, biyogüvenlik seviye II ve III güvenlik kabinlerinde standartlara uygun olarak yapılmalıdır. (27,37,43).

1.5 Mikobakteri Türlerine Genel Bir Bakış ve Klinik Özellikleri

1.5.1 *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

Mycobacterium tuberculosis, *M. bovis*, *M. africanum* ve *M. microti* türleri bu kompleks içinde yer almaktadır. Çok sayıda genin karşılaştırmalı dizi analizleri, bu 4 tür arasında minimal polimorfizm olduğunu ortaya koymuştur (41,49). Ancak türler arası ayırım özellikle hastalığın epidemiyolojisi açısından büyük önem taşımaktadır. *M. tuberculosis* kompleks içinde yer alan türlerin ayırt edilmesinde fenotipik tiplendirme yöntemleri her zaman yeterli olmamaktadır Bu nedenle fenotipik özellikleri yanında çeşitli genetik belirteçlerden de yararlanılmaktadır (6,49).

Son yıllarda gelişen moleküler teknikler sayesinde, *M. tuberculosis* kompleks' de yer alan türlerin DNA bölgelerinde yüksek derecede polimorfizm olduğu gösterilmiştir. *M. tuberculosis* kompleks' teki bu genetik homojeniteye rağmen yüksek orandaki DNA polimorfizmi, insersiyon elementleri ve kısa tekrarlayan DNA dizileri ile ilişkilidir. Belirgin mobilitesi ve genomdaki ortalama kopya sayısının yüksekliği nedeniyle, özellikle IS6110 genetik polimorfizmi saptamada en çok kullanılan belirteçlerden birisidir. *M. tuberculosis* kompleks' te yer alan türlerin doğru tanımlaması ve genetik polimorfizmin saptanması halk sağlığı için risk oluşturan potansiyel kaynakları belirlemek için çok önemlidir ve moleküler tekniklerin bu amaçla kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (6,41).

Mycobacterium tuberculosis hasta kişilerin hapşırması, öksürmesi, ile havaya yayılan ve havada asılı kalan 1-5 µm çapındaki damlacık çekirdekleri ile taşınır. Damlacık çekirdekleri üst solunum yollarının oluşturduğu fiziksel engelleri aşabilmekte ve ilk enfeksiyonun olduğu alveole ulaşabilmektedir. Alveole ulaşan basil farklı yollar izleyebilir (26).

Başlangıç konak yanıtı oldukça etkilidir ve alınan basillerin tamamı yok edilir.

Basil başlangıçta çoğalabilir, fakat gelişen bağışık yanıtla enfeksiyon kontrol altına alınır ve koruyucu bağışıklık gelişir. Primer enfeksiyon olarak adlandırılan bu durum hiçbir klinik belirti oluşturmamasına karşın PPD testinin pozitifleşmesine neden olur. Bu süreçte az sayıda basil metabolizmalarını durdurarak canlılıklarını koruyabilirler (dormant basiller) ve bu durum latent enfeksiyon olarak tanımlanır.

Basiller enfeksiyonu takiben çoğalmaya devam edebilirler ve primer tüberküloz adı verilen klinik tabloya neden olabilirler (Şekil I).

Primer enfeksiyon sırasında dormant halde kalan basiller primer enfeksiyondan yıllar sonra yaşamın herhangi bir dönemine çoğalmaya başlayabilirler ve reaktivasyon veya sekonder tüberküloz adı verilen klinik tabloya neden olabilirler (31,36).

Toplumun bazı kesimlerinde tüberküloz prevalansı daha yüksektir. (43).

Erişkin akciğer tüberkülozu yavaş ilerleme gösteren inflamatuvar bir süreç olup yoğun inflamasyon, nekroz ve kazeifikasyonla karakterizedir. Kazeifikasyon nekrozu sonucu oluşan kaviteler bronşlara açılabilir, bu şekilde etken akciğerin diğer bölgelerine yayılabildiği gibi öksürme, hapsırma, konuşma gibi kuvvetli ekspirasyona neden olan durumlarla havaya saçılabilirler (37).

1.5.2 *M. avium intracellulare* kompleks (MAC)

MAC kompleksi *M. intracellulare* ve *M. avium* türlerinden oluşur (44). MAC, ABD ve gelişmiş bir çok ülkede en sık hastalık etkeni olan MOTT türüdür. İnsandan insana bulaş gösterilmemiştir (45).

Bu kompleks içinde yer alan iki türü klasik fenotipik özellikleriyle ayırt etmek mümkün değildir, birbirlerinden ayırımı sağlayan en eski yöntem aglütinasyon yöntemidir. MAC hücre duvar glikolipidlerine göre 28 serotipe sahiptir. Birkaç yöntemle tiplendirilir. DNA problemleri

ile tip 1-6, 8-11 ve 21' in *M. avium* tipleri olduğu, tip 7, 12-20 ve 25' in *M. intracellulare* olduğu gösterilmiştir (28). Tip 22, 23, 26 ve 28' in ise her iki türe ait proba da reaksiyon vermemesi MAC içinde yer alan başka bir türün varlığını göstermektedir (22). Bu kompleks içindeki iki tür birbirlerinden 16S rDNA dizi analizi ve bunun yanı sıra *hsp65* PRA yöntemi ile de kolaylıkla ayrılır (66).

MAC kompleksi içinde yer alan *M. paratuberculosis*, *M. lepraemurium* ve *M. silvaticum* türlerinin ise *M. avium*' un alt türleri olarak kabul edilmesi gerektiği ileri sürölmektedir. *M. subspecies lepraemurium* insanlarda hastalık etkeni değildir, kemirgen patojeni olarak kabul edilir (76). *M. avium subspecies silvaticum* geyiklerde enterit etkeni, kuşlarda tüberküloza neden olan bir patojendir. *M. avium subspecies paratuberculosis* geviş getiren hayvanlarda Johne' s hastalığının etkenidir. Kesinlik kazanmamakla birlikte Crohn hastalığı ile ilişkili olabileceği düşünölmektedir (70).

Son yıllarda özellikle bağışık sistemi baskılanmış, kortikosteroid kullanan ve AIDS olgularında MAC enfeksiyon prevelansı gittikçe artmaktadır. (35).

1.5.3 *M. kansasii*

Yavaş üreyen, fotokromojen, potansiyel patojen olduğu kabul edilen bir türdür. 16S rDNA gen dizi analizi ile nonfotokromojen, pigmentsiz nonpatojen bir tür olan *M. gastri*' ye çok benzemektedir. Ancak bu iki türün ayrırımı *hsp65* gen dizi analizi ile yapılabilmektedir (69).

En fazla kaviter akciğer enfeksiyonu şeklinde göröölür. Tüberkülozdan daha hafif bir tablo oluşturur. Servikal lenfadenit (özellikle çocuklarda), deri abseleri veya piyojenik enfeksiyonları takip eden selölit, artrit, fasiit ve osteomyelite neden olur (76). *M.kansasii*

olgularının çoğunluğunun şehirlerde saptanması dolayısıyla hava kirliliği ve tozlu ortamlarının enfeksiyonlardan sorumlu olabileceği görüşünü desteklemektedir (71).

1.5.4 *M. marinum*

Rezervuarı su ve suda yaşayan canlılardır. *M. marinum* zedelenen deri bölgesinin kontamine tuzlu veya tatlı su ile veya balık ile teması sonucunda deri enfeksiyonlarına neden olur (10).

İki formda karşımıza çıkabilir. Yüzme havuzu granülomu en sık görülen şeklidir. Genellikle el parmakları, kol, dirsek, diz kapağı ve bacakta küçük bir papülle başlar, deri altı nodülü halini alarak verüköz forma dönüşebilir. Granülomatöz ülser gelişir. Ülserler birkaç ay içinde kendiliğinden iyileşebileceği gibi bazı olgularda 2 yıl veya daha uzun süre devam edebilir.

Diğer formda ise papül abseleşir ve lenfatikler boyunca sekonder nodüller oluşabilir (35, 58).

Yüzeyel enfeksiyonlar genellikle spontan iyileşir, fakat hastalık seyri genellikle uzun ve rahatsızlık vericidir. Bağışık sistemi baskılanmış kişilerde disseminasyon, sinovit ve osteomyelit olguları bildirilmiştir (58).

1.5.5 *M. ulcerans*

M. tuberculosis, *M. marinum* ve *M. haemophilum* türleriyle filogenetik olarak yakındır.

Biokimyasal deneyler, “high-performance liquid chromatography” (HPLC) ve *hsp* 65 PRA yöntemiyle bu türlerden ayırt edilebilir. Biokimyasal deneylerden sadece katalaz pozitifdir (76).

1.5.6 *M. haemophilum*

Mikobakteriler için demire ihtiyacı olan tek türdür. Üremeleri için 10 hafta veya daha fazla inkübasyona ihtiyacı vardır. Biokimyasal testlerden sadece pirazinamidaz testi pozitifdir. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyon gelişebilir. (58,76). En fazla görülen klinik form deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarıdır. (74).

1.5.7 *M. scrofulaceum*

MAC kompleks ile antijenik ve ilaç duyarlılığı açısından olan benzerlikleri nedeni ile herikisini bir arada MACS olarak gruplandırılmıştır, fakat bu tanımın doğru olmadığını genotipik çalışmalar göstermiştir (76,70). *M. simiae* ve *M. interjectum* türlerinden biokimyasal özellikleri ile ayırt etmek zordur. Şüpheli durumlarda *hsp65* ile tanımlanabilmektedir. *M. scrofulaceum* doğada çok yaygın olarak bulunan bir türdür. Sıklıkla klinik örneklerden ve laboratuvarında kontaminant bakteri olarak izole edilirler. (35).

En fazla görülen hastalık şekli çocuklarda submandibular bölgede tek veya çoklu nodül ile ortaya çıkan lenfadenittir. Tedavi edilmeyenlerde rüptür sonucu fibrozis ve kalsifikasyon oluşur. *M. tuberculosis* ve MAC nedeniyle oluşan lenfadenitlerden ayırım önemlidir. Nadiren ilerleyici akciğer, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olur (58).

1.5.8 *M. malmøense*

1977 yılında Malmö’de akciğer hastalığı olan dört hastadan izole edilmiştir. Nonkromojen gruptaki MAC ile çok karıştırılır. Sıklıkla akciğer enfeksiyonuna neden olur. Nadiren lenfadenitli olgulardan izole edilir, ancak disseminasyon oldukça yaygındır (35).

1.5.9 *M. interjectum*

İlk defa 1993'te lenfadenopatili bir çocuğun lenf bezinden izole edilmiştir. TLC paterni MAC ve *M. scrofulaceum*' a benzerdir. 16S rDNA çok değişken bölgesinin *M. simiae* ile çok yakın genetik ilişkisi gösterilmiştir. İzolasyonların klinik önemi tartışılabilir (70).

1.5.10 *M. simiae*

Neden olduğu enfeksiyonlara seyrek rastlandığından hastalığın epidemiyolojisi ve klinik özellikleri tam açıklığa kavuşmamıştır. Çoğu olguda önceden geçirilmiş bronkopulmoner hastalık, kortikosteroid kullanım hikayesi veya altta yatan ciddi bir neden vardır. Diğer mikobakteriyel enfeksiyonlardan ayırt edilemeyen akciğer hastalığına sebep olur. Disseminasyon nadirdir (35).

1.5.11 *M. gordonae*

Mycobacterium gordonae skotokromojendir. Örneklerden izole edildikleri zaman, her izolat doğru olarak tanımlanmalı ve klinik öneminin saptanması için klinik ilişkisi dikkatli bir şekilde belirlenmelidir. (35).

1.5.12 Hızlı Üreyen Mikobakteriler (RGM):

- I. *M. fortuitum* grup
- II. *M. chelonae/abcessus* grup
- III. *M. smegmatis* grup

Bu gruptakilerin tanımlaması için anahtar özellikleri mikolik asit olarak bilinen uzun zincirli yağ asitlerinin bulunması, primer izolasyonlarında katı besiyerinde 7 gün içinde gözle koloni oluşturarak üremeleri, 3 gün veya 2 hafta içerisinde arilsülfataz aktivitesi ve pigmentasyonun olmayışıdır (58).

Pigmentsiz RGM olumsuz koşullara dayanıklıdır ve çoğu çevresel zararlara rağmen çoğalabilir. *M. chelonae/abcessus* grup ve *M. mucogenicum* dezenfektanlar ve biosidlerin (klor ve gluteraldehid gibi) aktivitelerine direnç gösterir. Son zamanlarda su boru sistemlerinden alınan biofilmlerin %90' nından fazlasında aside dirençli mikobakterinin varlığı tanımlanmaktadır. (58).

ABD' de en çok nozokomiyal salgınlar oluşturmaktadır. Sağlık çalışanları ile ilişkili salgınlar, musluk sularına veya buz-buzlu su-su bazlı solüsyonlar gibi su kaynakları ile maruziyet sonucu oluşur. Kontamine olmuş cihazlar RGM' ler (özellikle *M. fortuitum*) için önemli bir hastane deposudur. Bildirilen hastalık salgınları; sternal yara enfeksiyonları, plastik cerrahi sonrasındaki cerrahi yara enfeksiyonları ve rejeksiyon sonrası abseler şeklindedir. Kateter enfeksiyonları *M. mucogenicum* dahil RGM ile ilişkilendirilmektedir. Sporadik, toplumsal kaynaklı lokalize enfeksiyon, travmatik bir yaralanmayı takiben su ve toprakla kontaminasyon ile oluşur (73,74).

1.6 Laboratuvar Tanı

Mikobakteri enfeksiyonlarının kesin tanısı, uygun klinik örneklerden bakterilerin izole edilmesiyle konur. Özellikle tüberküloz olgularının halk sağlığını tehdit ettiği günümüzde etkin mikrobiyal tedavinin hemen uygulanabilmesi, artan mikobakteri enfeksiyonlarının doğru ve güvenilir tanısının konabilmesi ve epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesi için kısa

sürede sonuç verebilen duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla hızlı kültür sistemleri ve moleküler yöntemler geliştirilmiştir (27,37,43).

1.6.1 Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Laboratuvar tanısındaki başarı klinik örneğin uygun şekilde alınması ve dikkatli bir şekilde çalışılmasına bağlıdır. Örnekler antitüberküloz tedaviye başlanmadan önce alınmalıdır. Kültür için gelen örneklerin çoğu solunum yolu örnekleridir. Doku, normalde steril olan vücut sıvıları, idrar ve gastrik aspirat diğer sık gelen örneklerdendir. Kan ve dışkı örnekleri ise AIDS'li hastalardan kabul edilebilir (43). Hastadan alınacak örnekler enfeksiyonun bulunduğu bölgeye göre değişebilir.

A. Aseptik koşullarda alınan örnekler

Vücut sıvıları (beyin omurilik, plevre, perikard, sinoviyal, asit sıvıları, kan, kemik iliği, cerahat) ve dokular gibi örneklerde aside dirençli bakteri izolasyonu oldukça zordur.

B. Kontamine olma olasılığı olan örnekler

Akciğere ait balgam, bronkoalveoler lavaj, bronş yıkama sıvıları ve mide lavaj sıvıları gibi örnekler flora bakterileri ile kontamine olabilirler (37,43).

Normal flora üyelerini bulunduğu vücut bölgelerinden alınan örnekleri (balgam, idrar, dışkı vb.), besiyerlerine inokülasyonu öncesi, çeşitli ajanlarla (%2 NaOH+N-asetil-L-sistein, Dithiothreitol+%2 NaOH, %4 NaOH) dekontamine edilmesi ve klinik örneğin besiyerine inokülasyonundan önce konsantre edilmesi (santrifüj işlemi) gerekmektedir (27,37,43).

1.6.2 Mikroskopik inceleme

Aside dirençli boyama yöntemi (ARB), hala ucuz ve hızlı bir yöntem olarak, klinik örneğin mikobakteri açısından incelenmesinde ilk başvurulanan yöntemdir. Mikobakteriler, çeperlerinde önemli yer tutan mikolik asitler nedeniyle karbol fuksin gibi boyaları özgül olarak tutarlar ve asit alkol gibi güçlü renk çıkarıcı çözeltiler ile dahi boyalarını bırakmazlar. Mikobakteriler dışında *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Cryptosporidium* türleri ve *Legionella micdadei* aside dirençli olarak boyanabilir. Aside dirençli bakterilerin boyanmasında genellikle iki tip boya tercih edilir (35):

A. Karbolfuksin boyaları; fuksinin fenolle(karbolik asitle) karışımıdır.

a. Ziehl-Neelsen yöntemi (sıcak teknik)

b. Kinyoun yöntemi (soğuk teknik)

B. Florokrom boya:

a. Auromine O boyası.

b. Auromine-rhodamin boyası.

Mikroskopik inceleme ile örnekteki 5000-10000/ml basil saptanabilmektedir. Bazik fuksin temelli boyama yönteminde en az 300 alan, florokrom boyama yönteminde ise en az 30 alan incelenmelidir. (37,43).

1.6.3 Bildirici mikobakteriyofaj

Bütün mikobakterilerde veya sadece *M. tuberculosis*' te çoğalabilen fajlar vardır. Ateş böceğinde ışık üretiminden sorumlu olan lusiferaz enzimini kodlayan genin bu fajlara klonlanması ile bildirici mikobakteriofajlar elde edilir. Klinik örneklerde bu faj ile enfekte edilen basiller, lusiferin eklendiğinde ATP varlığında ışık oluşumuna yol açarak karanlık

alandaki görülebilirler. Bu şekilde canlı ve cansız bakteriler de ayırt edilebilir. Örnekte 500-5000 bakteri olması tanı için yardımcı olur (54).

1.6.4 Kültür yöntemleri

Kültür yöntemlerinin duyarlılığı çok yüksektir. Mikobakteri izolasyonunda bugün için altın standart olarak kabul edilen uygulama sıvı ve katı besiyerlerinin birlikte kullanılmasıdır. Mikobakterilerin izolasyonları ve bazı özelliklerinin saptanması için kullanılan besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. Katı özellikteki besiyerleri yumurta ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelenebilir (43).

Yumurta bazlı besiyerlerinden Lowenstein Jensen (L-J) besiyeridir. İlk izolasyon sırasında bu besiyerleri diğerlerine göre daha iyi sonuç vermektedir. Ancak koloni oluşumunun erken dönemde saptanamaması dezavantajıdır (37).

Agar bazlı besiyerlerinden en yaygın kullanılanı Middlebrook 7H10 ve 7H11' dir. Besiyerinin saydam olması nedeniyle mikroskopik yapıdaki kolonileri bile saptayarak 10-12 günlük bir sürede tanı konabilir. Middlebrook 7H10 besiyeri "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) tarafından agar proporsiyon yönteminde önerilmektedir. (37,47).

Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albümin gibi sıvı besiyerleri mikobakterilerin stok suşlarının pasajlanmasında ve ilaç duyarlılık testlerinde inokulum hazırlamak için kullanılır. Bakteri sayısının az olduğu örneklerden mikobakterileri izole etmek için kullanılmaktadır (43).

Lowenstein Jensen ve Middlebrook besiyerlerinde gözle görünür koloni oluşması 3-8 hafta kadar sürer. Bu sürenin azaltılabilmesi için hızlı, ticari kültür sistemleri geliştirilmiştir (43).

Yıllardır tüm dünyada yaygın olarak kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen hızlı kültür sistemi olan radyometrik BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Biosciences, Sparks, Md) sisteminde besiyerlerin radyoaktif madde içermesi, yarı otomatize olduğundan manuel doldurulup boşaltılması, enjektörlerin yoğun kullanılması, şişelerin cihazda okunmalarında çapraz kontaminasyon riski gibi nedenlerden dolayı alternatif sistemlerin geliştirilmelerine gereksinim duyulmaktadır (62,43). Bu sistemler yanında, manuel kullanım için bifazik kültüre dayalı Septi-Check AFB (BD Biosciences, Sparks MD), floresans bastırma temelli O₂ sensörlü MGIT (BD Biosciences, Sparks MD) ve tetrazolium tuz indikatörünün indirgenmesiyle işleyen MB-Redox (Heipha Diagnostics, Biotest, Heidelberg, Germany) bulunmaktadır (27,43, 61).

1.7 Mikobakterilerin Tanımlanması

1.7.1 Fenotipik Testler

Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları gereklidir. Her mikobakteriyoloji laboratuvarının tüm izolatları tanımlayabilecek düzeyde olması gerekli değildir. Ancak tüberküloz basillerinin etken olma sıklığı ve enfektivitesi göz önüne alındığında, en azından *M. tuberculosis* kompleksin tanımlanmasında kullanılan anahtar testlerin uygulanması gerektiği düşünülmektedir (43). Bir bölgede izole edilen bir türün prevelansı azaldıkça uygulanan deneylerin pozitif prediktif değeri düşer (30). Bu nedenle anahtar deneyleri seçerken önce o coğrafik bölgedeki mikobakteri türlerinin dağılımının bilinmesi ve en sık rastlanan türlerin pozitif sonuç verdiği bilinen deneylere seçimde öncelik verilmesi gerekir. Mikobakteri türlerini önce Runyon' un önerdiği şekilde gruplandırmak ve sonra her grupta sık

rastlanan türlerle en çok pozitif sonucu veren biyokimyasal deneyleri seçmek kabul edilmiş esastır (37,43).

Mikobakteri türlerinin tanımlanmasında fenotipik karakterlerin belirlenmesi önemli bir yer tutar. Bunlar arasında koloni morfolojisi, boyanma özellikleri ve biyokimyasal reaksiyonlar yer alır (67).

Üreme Hızı ve Pigment Üretimi

Uygun dilüsyonlarda katı besiyerlerine yapılan pasajlarında yedi günden önce üreyenlere hızlı üreyenler, yedi günden sonra üreyenlere yavaş üreyen mikobakteriler olarak kabul edilirler. Karşılaştırmalı 16S rDNA dizilerinden elde edilen bilgi de kesin olarak hızlı ve yavaş üreyenleri ayırmaktadır (43). Yavaş üreyenler pigment üretme özelliklerine göre üç gruba ayrılır: skotokromojen, fotokromojen ve nonkromojen (37). Işıktaki pigment oluşturma özelliği oksijen ve sıcaklık parametreleriyle ilişkili bulunmuştur (72).

NAP testi (Nitro- α -Acetylamino- β -Hydroxypropriophenone) Deneyi

Radyometrik BACTEC yöntemine adapte edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda inhibitör maddenin 10 μ g/ml' den, 5 μ g/ml' ye düşürerek, NAP deneyinin radyometrik sistemde de başarılı sonuçlar verdiğini, deney süresinin 4-6 güne indirdiğini göstermiştir (44).

Niasin Birikimi

Niasin (nikotinik asid) mikobakterilerin metabolik süreçleri esnasındaki NAD (nikotinik asid adenin dinükleotit) ve NADP (nikotinik asid adenin dinükleotit fosfat) koenzimlerinin biyosentezinde öncül bir maddedir. (37,43).

Nitrat Redüksiyonu

Birkaç mikobakteri türü ile çoğu mikobakteri izolatları nitratların nitrite indirgenmesini katalizleyen nitrat redüktaz enzimine sahiptir. Besiyerinde nitritin varlığı, sülfanilamid ve N-naphthylethylenediamine ilavesi sonucu kırmızı rengin oluşmasıyla anlaşılır (37).

Tween 80 Hidrolizi

Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) deterjan etkilidir. pH' ısı 7'ye ayarlanmış besiyerinde, Tween 80 besiyeri içerisindeki nötral kırmızısı ile bağlanır ve serbest haldeyken pH 7 iken kırmızı olan nötral kırmızısı saydam sarı renk alır. Besiyerine ekilen bir mikobakteri suşu lipaz üretebiliyorsa, Tween 80' i oleik asit ve polyoxyethylene sorbitol' e hidrolizler ve serbest kalan nötral kırmızısının rengi kırmızıya dönüşür.

Katalaz

Katalaz hidrojen peroksidi (H_2O_2) su ve oksijene parçalayan bir hücre içi enzimidir. Katalaz aktivitesini saptamak için iki test kullanılmaktadır: semikantitatif katalaz testi ve ısı tolerans testi (43). Semikantitatif katalaz testi mikobakterileri, ürettikleri köpüğün tüpte oluşturduğu yüksekliğe göre (45 mm' den fazla ve daha az köpük yapanlar) yüksek katalaz ve düşük katalaz üretenler olarak ikiye ayrılırlar (73).

Çoğu mikobakteri türü 68°C' de ısıtılınca katalaz aktivitesini korurlar. Çoğu *M. tuberculosis* suşu diğer *M. tuberculosis* kompleks üyelerinden ısıya dirençli katalaz üretememeleri ile ayrılabilir. *M.gastri* de ısıya dirençli katalaz üretemez (37,43).

Arilsülfataz Aktivitesi

Arilsülfataz enzimi renksiz bir madde olan tripotasyum fenolftalein gibi maddelerin sülfat grubu ile aromatik halka arasınındaki bağı hidrolize eder. Serbest kalan fenolftalein ortam bazikleştiğinde kırmızılaşır (43). Hızlı üreyen mikobakterileri, grup III non fotokromojenik mikobakterilerden ayırdetmede yararlı bir testtir (37).

Üreaz Aktivitesi

Üreaz enzimine sahip mikobakteriler üreyi hidrolize ederek amonyak serbestleştirir, bu da ortam pH'sını yükselterek rengin değişmesine neden olur. *M. scrofulaceum* (pozitif) ve *M. gordonae* (negatif) türlerinin ayırımında kullnılan önemli bir testtir. *M. gastrii*' yi diğer diğer grupIII non kromojenelerden ayırımda önemlidir (37)

Pirazinamidaz Deneyi

Pirazinamidaz enzimi pirazinamidi hidrolize ederek pirazinoik asid ve amonyağa çevirir. Besiyerine ferröz amonyum sülfat eklenirse pirazinoik asit iki değerlikli demirle birleşir,.besiyeri yüzeyinin altında kırmızı renkli halka oluşur. *M. tuberculosis-M. bovis*, *M. kansasii-M. marinum*, MAC üyelerinin ayırımında pirazinamidaz testi kullanılır (37,43).

Tablo-I. Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biokimyasal özellikler (37,43).

Tür	Optimal Sıcaklık °C	Niasin	TCHde Üreme	Nitrat reduksiyonu	Semikant. katalaz >45mm	68°C katalaz	Tween hidrolizi 5 günlük	Tellürit reduksiyonu	%5 NaCl tolerans	Demir alımı	Arisülüfataz 3 günlük	McConkey agarda üreme	Üreaz	Pirazinamidaz 4 günlük
<i>M. tuberculosis</i>	37	+	+	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	+
<i>M. bovis</i>	37	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-
<i>M. africanum</i>	37	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. marinum</i>	30	±	+	-	-	-	+	±	-	-	±	-	+	+
<i>M.kansasii</i>	37	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	+	-
<i>M. simiae</i>	37	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>M. asiaticum</i>	37	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	37	-	+	-	+	+	-	±	-	-	D	-	D	±
<i>M. szulgai</i>	37	-	+	+	+	+	±	±	-	-	D	-	+	+
<i>M. goodii</i>	37	-	+	-	+	+	+	-	-	-	D	-	D	±
MAC	37	-	+	-	-	±	-	+	-	-	-	±	-	+
<i>M. genavense</i>	37	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>M. goodii</i>	37	-	+	-	-	-	+	±	-	-	-	-	±	-
<i>M. malmoense</i>	37	-	+	-	-	±	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>M.haenophilum</i>	30	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M shimoidei</i>	37	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. ulcerans</i>	30	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. flavescens</i>	37	-	+	+	+	+	+	±	+	-	-	-	+	+
<i>M. xenopi</i>	42	-	+	-	-	+	-	±	-	-	±	-	-	D
<i>M. terrae</i> kompleks	37	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	D	-	D
<i>M. fortitutum</i> grup		±	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. chelonae</i>		D	-	-	+	D	D	+	-	-	+	+	+	+
<i>M. abscessus</i>		D	-	-	+	D	D	+	+	-	+	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>				+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

Tiyofen-2-Karboksilik Asit Hidrazid (T2H) ile Üremenin İnhibisyonu

Çoğu mikobakteri T2H içeren besiyerinde üreyebilirken, *M. tuberculosis*' i seçici olarak inhibe eder. *M. bovis* suşlarının, *M. tuberculosis* ve diğer yavaş üreyen nonkromojenlerden ayırımında özellikle yararlıdır. Bazı *M. bovis* suşlarının niasin zayıf pozitif olduğu durumlarda *M. tuberculosis*' ten ayırtettirici özellik olmaktadır (37).

Sodyum Klorür Tolerans Deneyi

% 5' lik NaCl içeren L-J besiyerinde üreyebilme yeteneği, 28°C'de inkübe edildikleri zaman, yavaş üreyenlerden sadece *M. triviale*, *M. flavescens*' in bazı suşları, *M. abscessus* ve *M. fortuitum* için ortak bir özelliktir (37,43).

McConkey Agarda Üreme

Kristal viyole içermeyen McConkey agar RGM' in üremelerini sağlar. Diğer mikobakterilerin çoğu üreyemez (37).

Biyokimyasal deneyler, mikobakteri tanımlanması için yapılan çalışmalarda hala önemini korurken, klinik laboratuvarlarda yakın zamana kadar geleneksel olarak kullanılan altın standart kabul edilen yöntemdi. Ancak metodolojisinin çok emek yoğun olması, 3-10 hafta gibi sürelerde sonuçlanması, suşların fenotipik değişkenlik (aynı türe ait suşların bir fenotipik özelliği göstermemesi), fenotipik homojenite(değişik türlerin aynı biyokimyasal özelliklere sahip olması) ve düşük tekrarlanabilirlik göstermesi, rutin klinik laboratuvarları daha kolay, hızlı, güvenilirliği yüksek olan moleküler biyolojik tanımlama yöntemlerine yöneltmiştir (67).

Mikobakteri tanımlaması için alternatif yöntemler, kromatografi ile mikolik asit analizleri ve nükleik asit dizi analizi, nükleik asit amplifikasyonu, nükleik asit problemlerinin kullanıldığı genetik

yöntemlerden oluşmaktadır. Ancak fenotipik ve genotipik yöntemlerin kombine edilmesi, mikobakterilerin tanımlaması için önerilen stratejidir (43).

Mikolik Asit Analizi

Mikolik asitler mikobakteriyel hücre duvarının lipid içeriğinin en önemli komponentidir. Mikolik asitler karbon atomlarının sayısı ve farklı fonksiyonel grupların varlığına göre ayrılırlar. Hücre duvarının mikolik asit paterni genellikle türler arasında değişiklik göstermektedir. Bu nedenle mikolik asit analizi mikobakteri türlerinin tanımlanmasında önemli bir araç olmaktadır. Mikolik asit analizi için thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC) ve gas-liquid chromatography (GLC) teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikler içinde mikobakterilerin tanımlanması için en güvenilir teknik HPLC' dir. TLC ve GLC ile farklı türler arasında ortak mikolik asit profilleri saptanmaktadır (70).

1.7.2 Genotipik testler

Direkt Amplifikasyon Testleri

Direkt amplifikasyon testleri klinik örneklerden mikobakteri nükleik asitlerinin doğrudan saptanmasını sağlamaktadır. FDA (Food Drug Administration), klinik örneklerden *M. tuberculosis* saptanması için iki teste onay vermiştir. Amplified *M. tuberculosis* Direct test (E-MTD: Gen-Probe, San Diego, CA, ABD) ve The Amplicor *M. tuberculosis* Test (Amplicor; Roche Diagnostic Systems Inc., Branchburg, NJ, ABD) (43).

E-MTD (Amplified *M. tuberculosis* Direct test); yayma negatif ve pozitif olan, balgam, bronşiyal ve trakeal aspirat gibi solunum yolu örneklerindeki *M. tuberculosis* kompleks rRNA' sını çoğaltarak saptayan bir yöntemdir. MTD tek bir tüpte gerçekleşen çoğaltma ve saptama olmak üzere iki aşamadan oluşur. Yöntem transkripsiyon aracılı çoğaltma prensibi ile çalışır. Her hücre için 2000 kopya düzeyindeki rRNA' yı saptar. Bu da hedef dizinin tek kopya veya düşük

düzeydeki kopya olduğu testlere bir üstünlük sağlamaktadır. “Polimerase chain reaction” (PCR)’ dan farkı izotermal olması ve tek tüpte çalışılmasıdır. Bu da kontaminasyon riskini azaltmaktadır (38,66).

The Amplicor *M. tuberculosis* Test; PZR esaslı bir testtir. Bu yöntemde mikobakteri DNA’ sının 16S rDNA gen bölgesine ait tür spesifik primerler ve işaretli *M. tuberculosis* kompleks’ e ait problr kullanılır. Örnek hazırlanması, amplifikasyon ve saptama aşamalarından oluşur (43).

Mevcut sonuçlar negatif moleküler tanı testlerinin tek başına tüberkülozu elimine edemediği gibi, yalnızca PZR pozitifliğinin tüberkülozu doğrulamada yetersiz kalabileceğini göstermektedir. Mikroskopisi pozitif örneklerde atipik mikobakterilerden ayırımında kullanılabilir. Nükleik asit amplifikasyon testlerinin ölü-canlı basil ayırımını yapamadığı dikkate alınırsa bu testlerin tedavi altındaki hastalarda kullanılmamaları gerekmektedir (47,51).

Nükleik asit hibridizasyon yöntemleri

Mikobakterilerdeki yaklaşık 280 baz çifti uzunluğundaki “internal transcribed spacer” bölgesi (ITS) 16S ve 23S rDNA gen bölgeleri arasında yer alır. Bu bölge tür içerisindeki polimorfizmle birlikte türler arası polimorfizm gösterir (42). ITS gen bölgesini hedef alan ve insanlarda hastalık etkeni olan mikobakteri türlerini saptayabilen INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics N.V., Zwijndrecht, Belgium) ve 23S rRNA genini hedef alan GenoType Mycobacteria CM/AS (CM, common mycobacteria; AS, additional species), (Hain Lifescience GmbH, Nehren Germany) gibi ters hibridizasyon testleri rutin olarak kullanılmaktadır. INNO-LiPA Mycobacteria v2 ile tek basamakta 16 farklı mikobakteri türü (*M. tuberculosis* kompleks, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae* grup, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. malmoeense*, *M. haemophilum*, *M. fortuitum-peregrinum* kompleks, *M. smegmatis*) tanımlanabilmektedir. GenoType Mycobacteria yönteminde ise tanımlanması istenen

mikobakteri izolatu önce daha sık görülen mikobakteri türlerinin saptandığı GenoType Mycobacteria CM testiyle değerlendirilir, bu testle tanımlanamayan mikobakteriler ise genellikle daha az görülen mikobakteri türlerini saptayan GenoType Mycobacteria AS testi ile tanımlanmaktadır (55, 77). *M. tuberculosis* complex-specific 23S ribosomal DNA bölgesi, *gyrB* DNA dizi polimorfizmleri, *M. bovis* BCG'nin RD1 delesyonunu hedef alan GenoType *M. tuberculosis* complex assay (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) ile *M. tuberculosis* kompleks alttürleri de tanımlanabilmektedir. (56).

Bu testler, rutin mikobakteriyoloji laboratuvarında mikobakterilerin doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanmasında çok yararlı bulunmuştur (55).

DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi mikobakteri türlerinin tanımlaması için altın standarttır (66). DNA dizi analizinde dört basamak vardır: nükleik asit izolasyonu, amplifikasyonu, nükleik asit hedefinin işaretlenmesi, işaretlenmiş hedeflerin elektroforetik olarak ayrılması ve elektroforezden elde edilen bilginin anlamlı DNA dizi bilgisine dönüştürülmesi. Yöntem Sanger' in zincir sonlandırma tekniği temeline dayanmaktadır. Bu yaklaşımda tek veya çok sayıda oligonükleotit primer ve denatüre edilmiş bir hedef dizi ile invitro olarak DNA sentezi gerçekleştirilir. DNA sentezi sırasında ortamda bulunan dideoksinükleotit trifosfat'ın (ddNTP) diziye eklenmesiyle zincir sonlandırılır. Oluşan fragmanların büyüklüğü sadece bir baz ile farklılık gösterir. Kapiller elektroforez ile DNA dizisi belirlenir. Çok sayıda flüoresan boyanın elde edilmesi ve lazer okuma teknolojileri sayesinde her dört nükleotidin bir geçişte aynı anda belirlenmesi mümkün olmaktadır. Elektroforetik görüntünün anlamlı DNA dizi verisine dönüştürülmesi, bilgisayar destekli algoritmalar ve manüel işleme ve dizi derlemesine gerek duyar. DNA dizisinin

değerlendirilmesi, raporlanması ve derlenmesi için çok sayıda program aracılı .veya veri tabanı yardımları kullanılmalıdır (2).

Mikobakterilerin tanımlanması amacıyla dizi analizi için hedef olarak seçilen en önemli gen bölgeleri, 16S rDNA, *hsp 65*, ITS, *gyrB*, *recA* ve *rpoB* genleridir.

16S rDNA bölgesi bakterilerin moleküler tanımlamasında altın standart olarak kabul edilen hedef bölgedir (66). Nükleotit değişikliklerinin spesifik bölgelerde yoğunlaştığı, bütün canlılarda yaygın olarak bulunan, yüksek oranda korunmuş bir gendir, bununla beraber tür-spesifik çok değişken bölgelerle karakterizedir. Bu da onu taksonomik amaçlar için ideal bir hedef haline getirir (66,70). Sınıf ayırımını gösteren nükleotit farkı sayısı için bir sınır değeri yoktur. Diğer bakteriler için önerilen 5-15 baz farkı, üyelerinin birbiriyle daha yakından ilişkili olan *Mycobacterium* genusu için uygulanamaz. Fenotipik olarak farklı olan birbiriyle yakın ilişkili türler arasında sadece birkaç baz çifti fark bulunurken, MAC üyelerinde ise 7 baz çiftlik veya daha fazla farklılığın gözlemlendiği genetik heterojenite gösterdiği bilinmektedir (70). 16S rDNA dizi analizi, çoğu mikobakteri türünün tanımlanmasını sağlar, ancak, *M. tuberculosis* kompleks üyelerini ayırt edemez. Benzer olarak önemli bir patojen olan *M. kansasii* ile patojenik olmayan *M.gastri* dizi analizi aynıdır. *M. marinum* ile *M. ulcerans*' in ayırtedilmesi için ek bölgelerin dizi analizi gerekmektedir (66).

hsp 65 geni mikobakteri türleri arasında yüksek oranda korunmuştur. Tanımlama amaçlı kullanılmakta olan çok değişken bölgeler (*M. tuberculosis* geninin 624 - 664 ve 683 - 725 pozisyonları) içerir. En sık nükleotit değişimleri korunmuş ya da fonksiyonel olarak benzer amino asitleri kodlayan kodon değişikliklerine yol açar. Bu da, *hsp65* proteininin, bakteriyel hücrelerin çevresel streslere direnç göstermesinde anahtar rolü olduğunu gösterir (24).

Hance ve arkadaşları 1989 yılında klinik örneklerden mikobakterileri saptamak ve tür spesifik problemlerle identifiye etmek için *hsp65* bölgesinin bir fragmanını amplifiye ettiklerini

bildirmişlerdir. Bundan sonra Plikaytis. ile Telenti ve arkadaşları ayrılmış gen bölgelerini kullanarak amplifiye edilmiş *hsp65* fragmanlarının restriksiyon enzim analizlerinin (*hsp 65* PRA) yapılmasıyla mikobakterilerin başarılı bir şekilde tanımlanmasını tarif etmişlerdir. 441 bazçiftlik dizinin PZR restriksiyon enzim patern analizi için, Telenti fragmanı olarak söz edilmektedir. Kapur ve arkadaşları mikobakterilerin tanımlaması amacıyla Telenti primerleri ile elde edilen amplikonların ilk defa dizi analizini yapmışlardır. Bu yöntem çok sayıda mikobakterinin grup ve türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır (42,70).

ITS (16S-23S rDNA internal transcribed spacer) olarak bilinen 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genler arasındaki bölge taksonomik ilginin yeni ortaya çıkan hedefidir (70).

Mycobacterium kansasii ile *M. gastri*, *M. malmoense* ile *M. szulgai*, *M. marinum* ile *M. ulcerans* ve *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin 16S rDNA gen dizi analizi ile ayırte edilmesi zordur, çünkü bu suşların çoğu, birbirinin aynısıdır. *Mycobacterium kansasii* ve *M. gastri* suşlar ITS dizi analizi ayırte edilebilir. Ancak *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin ITS dizisi aynıdır (33).

Çok zor olan ve manuel olarak yapıldığında yorumlama hatalarına konu olan genetik dizi analizi, günümüzde geliştirilmiş kimyası ve dizi analizi yöntemleri ile birlikte tam otomatik cihazların bulunması sonucunda daha kolay ve daha verimli bir şekilde yapılmaktadır. Ayrıca inanılanın aksine günümüzde çok ucuz olarak yapılmaktadır (70).

PCR-Restriction Endonuclease Analyses (PRA)

PRA (PCR-REA) yöntemi 1992 yılında Plikaytis ve arkadaşları tarafından mikobakterilerin hızlı bir şekilde tanımlanması için geliştirilmiştir. Bu teknik *hsp 65* genini hedef alan PZR, daha sonra amplikonların restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elde edilen ürünlerin elektroforezi aşamalarından oluşur (43,64).

hsp65, 16S–23S internal transcribed spacer(ITS), *rpoB*, 16S rDNA hedeflerine yönelik PRA yöntemi ile her mikobakteri türüne veya grubuna özgü bant patternleri gösterilmiştir. Bu hedefler arasında, *hsp65* ve *rpoB* genleri veya dizileri, sadece iki enzimle kesim yapılması nedeni ile umut verici hedeflerdir (11).

DNA Microarray

DNA microarray çok sayıdaki DNA dizilerinin hızlı bir şekilde incelenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu test, 16S rDNA, DNA gyrase sub-unit B (*gyrB*) veya *rpoB* genlerini tanıyan oligonükleotit problara, florokromla işaretli ampikonların hibridize olması esasına dayanmaktadır. Yayma pozitif örneklerde test 4 saatte tamamlanmaktadır (64).

Single Stranded Conformation Polymorphism Analyses (SSCP- Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)

Bu yöntemde hedef gen PZR ile çoğaltılır .Çoğaltılmış çift zincirli DNA ısı ile denatüre edilerek tek zincirleri elde edilir. Tek zincirlerin renatürasyonu sonrasında, farklı dizilerdeki parçalar farklı tersiyer konformasyonlar oluştururlar. Bu parçalar elektroforez ile ayrıştırıldığında her parça farklı hızda hareket eder. Bu yöntem temel olarak genomik DNA'nın nokta mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılır. Mikobakterilerin tanımlamasında kullanılan SSCP yönteminde ise mikobakteriyel 16S rDNA' nın değişken bölgelerine özgül dört ayrı çift iplikçikli parça, dört çift floresan primerle çoğaltılmakta ve elde edilen ürünlerin SSCP analizi yapılmaktadır. Bu yöntemle sonuç 30 dakika içinde alınabilmekte ve kapiller elektroforez ile aynı anda 16 örnek test edilebilmektedir (24).

2 GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kimyasal Bileşikler, Besiyerleri, Kitler

Tris (Amiesco, ABD)

Borik asit (Scharlau, İspanya)

Etilendiamin tetraasetik asit (Carlo Erba)

Agaroz (Sigma, ABD)

Yükleme tamponu

Etidyum Bromid (10mg/ml distile su içinde)

dNTP (Bioron, Almanya)

Primerler

Buffer (Bioron, Almanya)

Taq polimeraz (Bioron, Almanya)

MgCl₂ (Bioron, Almanya)

Lowenstein Jensen besiyeri (Orbak)

Formamit (Applied Biosystems, ABD)

Isopropanol (Sigma, ABD)

BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, ABD)

Invisorb® Spin PCRapid Kit for purification of PCR-fragments (Invitek, Almanya)

0.5M EDTA hazırlanışı:

disodium EDTA. 2H₂O 186.1gr

Distile su ile 1L' ye tamamlandı.

NaOH ile pH 8 olarak ayarlandı.

5X TBE hazırlanışı

Tris base	54gr
Boric acid	27.5gr
EDTA 0.5M	20ml

Distile su ile 1000ml' ye tamamlandı.

10X TE hazırlanışı:

Tris Cl	10ml
EDTA 0.5M	2ml

Distile su ile 100ml' ye tamamlandı.

%2' lik Agaroz jel hazırlanışı:

1X TBE	75ml
Agaroz	1.5 gr

Yükleme Tamponu:

Orange G	25mg
Gliserol	3ml
5X TBE	2ml
H ₂ O	5ml

2.2 Aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Japonya)

Otoklav (Nüve, Türkiye)

Vorteks (MS2 minishaker, IKA)

Mikropipetler (Gilson, Fransa)

Yatay elektroforez

Isı döngü aletleri (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD)

ABI Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD)

Mikrosantrifüj ve soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya)

Isı bloğu (Bio TDB100, Boeco, Almanya)

Jel görüntüleme sistemi (Syngene, Ingenius, ABD)

pHmetre (Accumet, AB15, Fisher)

Manyetik karıştırıcı (Jenway 1000, hotplate & Stirrer, İngiltere)

Distile su cihazı (Seralpur PRO90C)

2.3 *M. tuberculosis* suşları

Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Merkezi, Mikrobiyoloji laboratuvarında tüberkülozlu hastaların klinik örneklerinden üretilen 64 mikobakteri suşu çalışmaya alınmıştır.

2.4 Yöntem

19 ve 48 nolu kaynaklar modifiye edilerek uygulandı. Döngüsel dizi analizi tepkimesi “ABI PRISM 310 genetic analyzer” cihazında üreticinin kullanım talimatına uygun olarak çalışıldı.

2.4.1 *hsp65* gen bölgesinin dizi analizi

64 mikobakteri izolatu *hsp65* geni dizi analizi ile tanımlandı. Bunun için kültürden kaynatma yöntemi kullanılarak mikobakteriyel DNA elde edildi. *hsp65* bölgesinin PZR ile çoğaltılması, PZR ürünlerinin görüntülenmesi, saflaştırma işlemi, döngüsel dizi analizi tepkimesi ve presipitasyon işleminden sonra kapiller elektroforez yapılarak diziler kromatogram dosyaları şeklinde kaydedildi

2.4.2 *gyrB* gen bölgesinin dizi analizi

Mycobacterium tuberculosis kompleks olarak tanımlanan suşlar, *gyrB* dizi analizi ile tanımlanarak kompleks içinde yer alan türlerin dağılımı saptandı.

hsp65 ve *gyrB* bölgelerinin dizi analizi için aşağıdaki basamaklar izlendi:

2.4.3 Kalıp DNA' nın hazırlanması

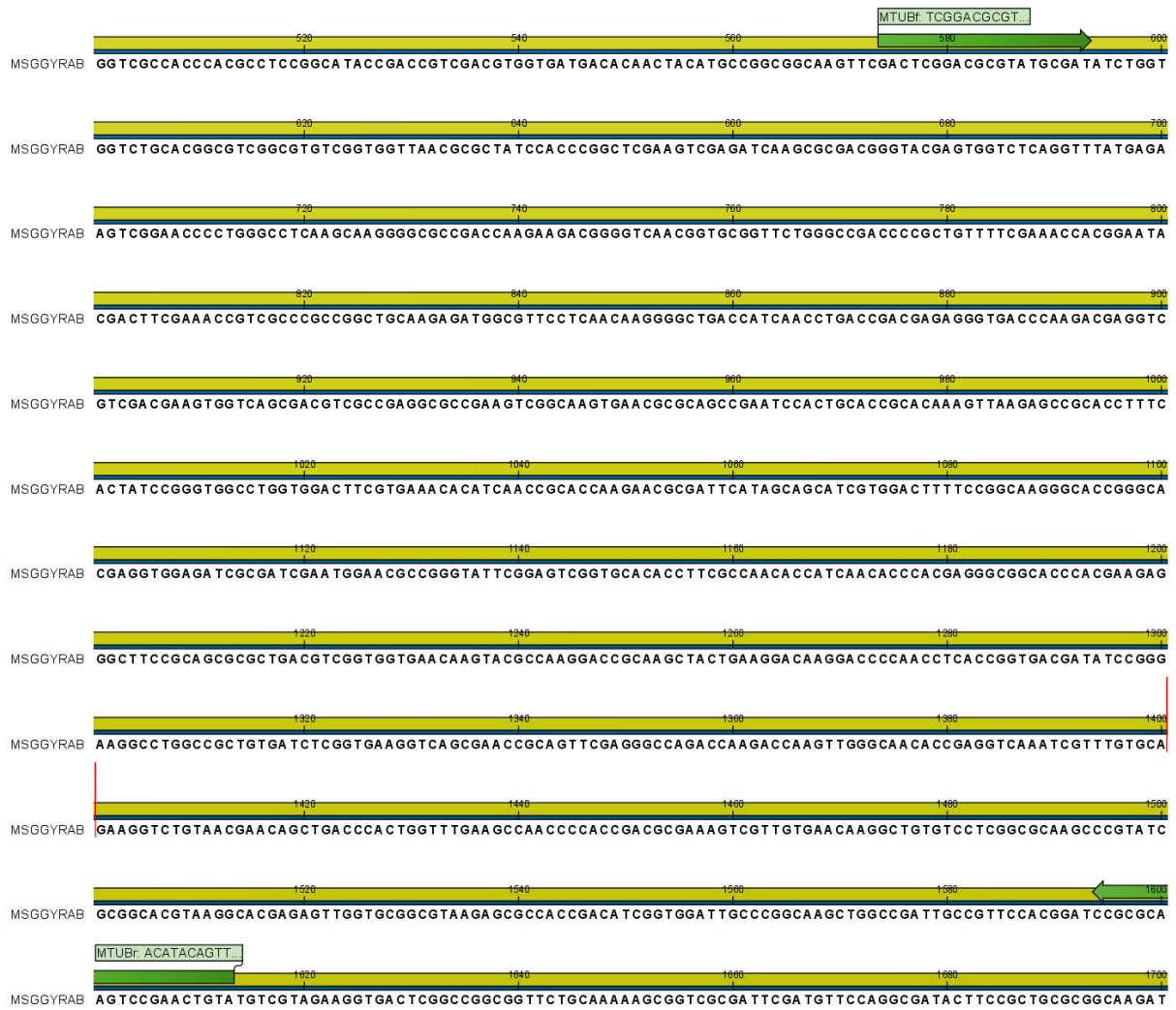
1. Birkaç bakteri kolonisi alınarak 750 µl TE içerisinde süspanse edildi.
2. Vorteks yapıldı.
3. 2 dakika 12 000 devir/dakika hızda santrifüj yapıldı.
4. Üst sıvı uzaklaştırıldı.
5. Yıkama işlemi iki kez tekrarlandı.
6. Pellet 250 µl TE içerisinde süspansiyon haline getirildi.
7. 20 dakika 95°C bekletilerek bakterilerin parçalanıp DNA' sının açığa çıkması sağlandı.
8. 2 dakika 12 000 devir/dakika santrifüj yapıldı.
9. Üst sıvı alınarak temiz bir tüpe aktarıldı.

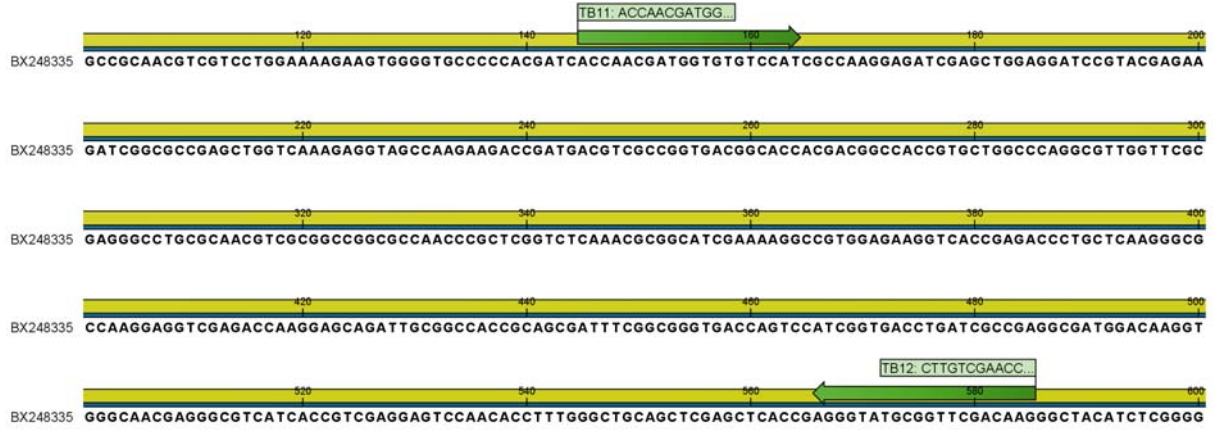
2.4.4 PZR Primerleri

hsp65 PZR için Tb 11 ve Tb 12, *gyrB* PZR için MTUBf ve MTUBr primerleri kullanıldı. Tb11 ve Tb12 primerleri ile mikobakteri tür tanımlanmasında kullanılan *hsp 65'* in 440 baz çiftlik bölgesinin ve MTUBf ve MTUBr primerleri ile de *gyrB* nin 1039 baz çiftlik bölgesinin çoğaltılması hedeflendi.

Tablo II. *hsp65* ve *gyrB* PZR için kullanılan primerler.

Primer adı	Primer dizisi (5'→3')	Ürün uzunluğu (baz çifti)	Birleşme sıcaklığı (°C)
Tb11	ACCAACGATGGTGTGTCCAT	440	60
Tb12	CTTGTCGAACCGCATACCT		
MTUBf	TCGGACGCGTATGCGATATC	1039	60
MTUBr	ACATACAGTTCGGACTTGCG		

Şekil I. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin ayırımında kullanılan MTUBf – MTUBr primer çiftinin *gyrB* üzerindeki yerleşimi.



Şekil II. *Mycobacterium* türlerinin ayırımında kullanılan TB11 – TB12 primer çiftinin *hsp65* üzerindeki yerleşimi.

Çoğaltma Karışımı

hsp65 PZR için optimum $MgCl_2$ ve primer konsantrasyonları saptandı. 1X tepkime tamponu ($MgCl_2$ süz) (Bioron), 1.5mM $MgCl_2$ (Bioron), 200 μ M dNTP(Bioron), 0.25 μ M Tb11, 0.25 μ M Tb12 primerleri ve 0.026U/ μ l Taq polimeraz içeren karışım toplam 35 μ l' den oluşmaktaydı. Bu şekildeki karışım örnek sayısına göre ayarlanarak PZR tüplerine 32.5 μ l dağıtıldı. Daha sonra bu karışıma 2.5 μ l bakterilerden elde edilen DNA eklendi.

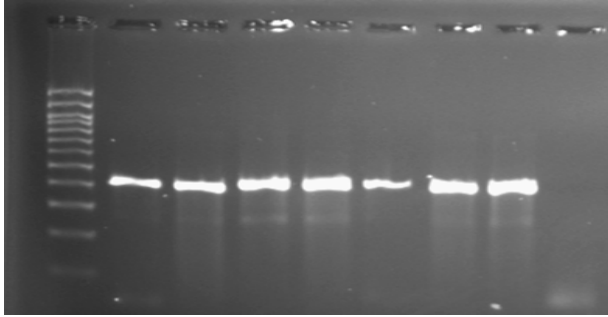
gyrB PZR için aynı karışım MTUBf ve MTUBr primerleri ile örnek sayısına göre hazırlandı ve DNA aynı miktarda eklendi.

2.4.5 PZR

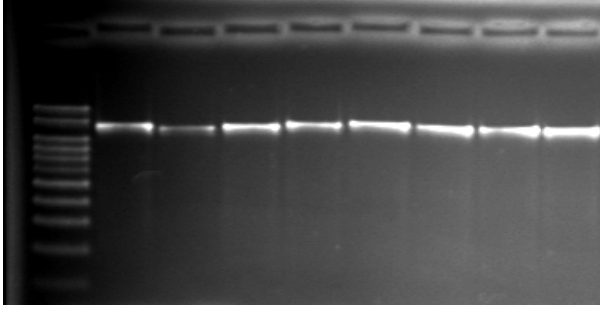
Çoğaltma karışımının konulduğu tüpler ısı döngü cihazlarına yerleştirildi. PZR döngüleri ve sıcaklıkları ayarlandı.

95°C	3 dakika (denatürasyon)	1 döngü
95°C	20 saniye (denatürasyon)	} 45 döngü
60°C	20 saniye (bağlanma)	
72°C	45 saniye (uzama)	
72°C	7 dakika	1 döngü

Çoğaltma işlemi yapıldıktan sonra elde edilen PZR ürünlerinden 2µl, yükleme tamponu ile karıştırılarak %2' lik agaroz içeren jele yüklendi. İlk çukura molekül ağırlık standardı yüklendi. Elektroforez 100V ile 45 dakika yürütüldü. Etidyum bromür çözeltisinde 20 dakika bekletilerek boyandı. 441 ve 1020 baz çiftlik DNA bantları UV ışık altında, görüntüleme sistemi yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı. DNA bantlarının görüldüğü örnekler saflaştırma işlemine alındı.



Resim 1. *Mycobacterium* suşlarının *hsp65* geni 440 baz çiftlik bölgesinin PZR ürünlerinin ve DNA moleküler ağırlık standardının görüntülenmesi.



Resim 2. *Mycobacterium* suşlarının *gyrB* geni 1039 baz çiftlik bölgesinin PZR ürünlerinin görüntülenmesi.

PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR ürünlerinin saflaştırılmasında, dizi analizi tepkimelerini etkileyen ortamda kullanılmayan nükleotit ve primerlerin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. *hsp65* ve *gyrB* PZR ürünleri “Invisorb® Spin PCRapid Kit for purification of PCR-fragments” saflaştırma sistemi ile protokol-1’ de önerildiği şekilde saflaştırıldı.

1. Karışım tamamen hazırlanan kolonlara yerleştirilen spin filtrelelere aktarıldı ve 1 dakika inkübe edildi.
2. PZR tepkime tüplerine direkt olarak 130 µl Buffer P eklendi.
3. 10 000 rpm’ de 30 saniye santrifüj edildi.
4. Üzerine 700 µl yıkama tamponu eklendi ve 10 000 rpm’ de 30 saniye santrifüj edildi.
5. Daha sonra filtre edilen sıvı boşaltıldı. Yıkama tamponundaki etanolün tamamen uzaklaştırılması için 14 000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi.
6. Daha sonra spin filtreler 1.5µl’ lik temiz tüplere yerleştirildi.
7. Filtre üzerine gelecek şekilde 20 µl deiyonize su eklendi. Oda sıcaklığında en az 3 dakika bekletildi. 10 000 rpm’ de 1 dakika santrifüj yapıldı.

Dizi analizi için kullanılacak bu saflaştırılmış DNA’ lar -20°C’ de saklandı.

2.4.6 Döngüsel Dizi Analizi Tepkimesi

Bunun için BigDye Terminator v3.1 kullanıldı. Toplam 10 µl' den oluşan karışım, dNTP, ddNTP ve Taq polimeraz içeren 1X tampon ve 0.160µM primer (Tb11, Tb12, MTUBf, MTUBr) primerlerinin herbiri için ayrı) içermektedir. Dizi analizi tepkimesinde incelenecek örnek sayısına göre, bu karışımın katları hazırlandı. PZR tüplerine 6µl dağıtıldı. 4µl saflaştırılma ürünleri eklendi ve dizi analizi tepkimesi için ısı döngü aletine yerleştirildi.

96°C	10 saniye	}	25 döngü
50°C	0.5saniye		
60°C	4 dakika		

2.4.7 Döngüsel Dizi Analizi ürünlerinin presipite edilmesi ve formamid ile çözülmesi:

Presipitasyon için Isopropanol yöntemi kullanıldı.

- Reaksiyon hacimleri distile su ile 20 µl'ye tamamlandı
- 80 µl %75 isopropanol eklendi.
- En az 20dakika, en fazla 24 saat olacak şekilde karanlıkta inkübe edildi.
- 20 dak maksimum hızda santrifüj edildi, üstteki sıvı hemen aspire edildi.
- Pellet 250 µl %75 isopropanol ile yıkandı.
- 5 dak. maksimum hızda santrifüj edildi, üstteki sıvı hemen aspire edildi.
- 5 dak 90°C' de kurutuldu, 25 µl formamid ile çözüldü.
- Kapiller jel elektroforezi için kullanılan tüplere aktarıldı ve elektroforeze kadar -20°C' de bekletildi.

2.4.8 Kapiler Jel Elektroforezi

- 95°C 'de 2 dakika, -20°C'de 1 dakika tutuldu.
- Ürünler cihaza yüklenene kadar buz üstünde bekletildi.

Böylece elde edilen DNA dizilerinin denatüre edilmesi sağlandı. “ABI Prizm310 Genetic Analyzer” kapiller jel elektroforez sisteminde denatüre edilen DNA’ lar yürütüldü. DNA dizileri cihaz tarafından kromotogram dosyaları şeklinde kaydedildi.

2.4.9 Dizi Analizi

hsp65 ve *gyrB* dizi analizi ile elde edilen veriler, “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) web sayfasındaki BLAST programı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gen bankası veri tabanı ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmak için “nucleotide-nucleotide blast” (blastn) programı seçildi.

3 BULGULAR

Atatürk Göğüs hastalıkları ve Cerrahisi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına 2005-2006 yılları arasında, gönderilen klinik örneklerden izole edilen 64 mikobakteriyel izolat çalışmaya alınmıştır. 63' ünde balgamdan, 1 hastanın da idrarından mikobakteri izole edilmiştir. İzolatların üreme zamanı, koloni morfolojisi, pigmenti değerlendirilmiş ve anahtar deney olarak niasin testi yapılarak ön tanımlanması yapılmıştır. Bu ön tanımlama sonucunda 64 hastanın, 62' si *M. tuberculosis*, ikisi de MOTT olarak tanımlanmıştır.

hsp65 gen dizi analizi sonuçlarına göre 64 adet mikobakteri suşunun tür dağılımı Tablo III' de gösterilmiştir.

Tablo III. *hsp 65* dizi analizi ile tanımlanan mikobakteri türleri.

		<i>hsp65</i> dizi analizi
<i>Mycobacterium</i>	<i>M. tuberculosis</i> kompleks	62
	<i>M. gordonae</i>	1
Mikobakteri dışı	<i>Nocardia asteroides</i>	1

hsp65 dizi analizi ile *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan 62 izolat, alt tür seviyesinde tanımlanmasını sağlayan *gyrB* dizi analizi ile tamamı *M. tuberculosis* olarak tanımlanmıştır.

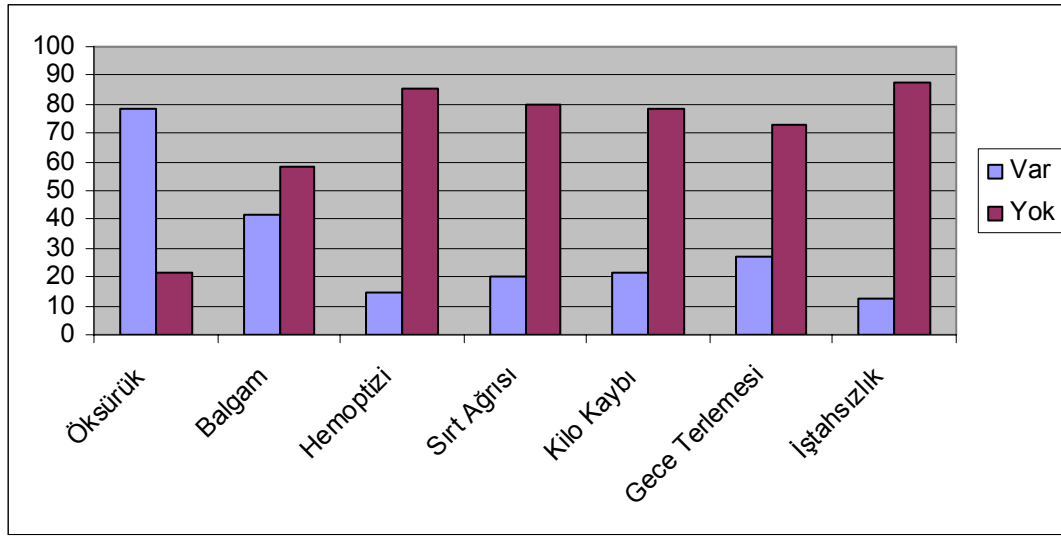
Ön tanımlama ile *hsp65* ve *gyrB* dizi analizi sonuçları tablo IV' te gösterilmiştir:

Tablo IV. *hsp65* ve *gyrB* dizi analizi ile tanımlanan *M. tuberculosis* kompleks türleri

		Fenotipik test		Toplam n(%)
		<i>M. tuberculosis</i> n(%)	MOTT n(%)	
Dizi analizi	<i>M. tuberculosis</i> n(%)	62 (96.8)	0	62 (96.8)
	MOTT n(%)	0	1 (50)	1 (1.6)
	<i>Nocardia asteroides</i> n(%)	0	1 (50)	1 (1.6)
Toplam n(%)		62 (100)	2 (100)	64 (100)

Hastaların semptomlarının yaygınlığının *M. tuberculosis* enfeksiyonu ile ilişkisi araştırılmıştır.

Bu hastaların klinik özellikleri Grafik 1’ de gösterilmiştir.



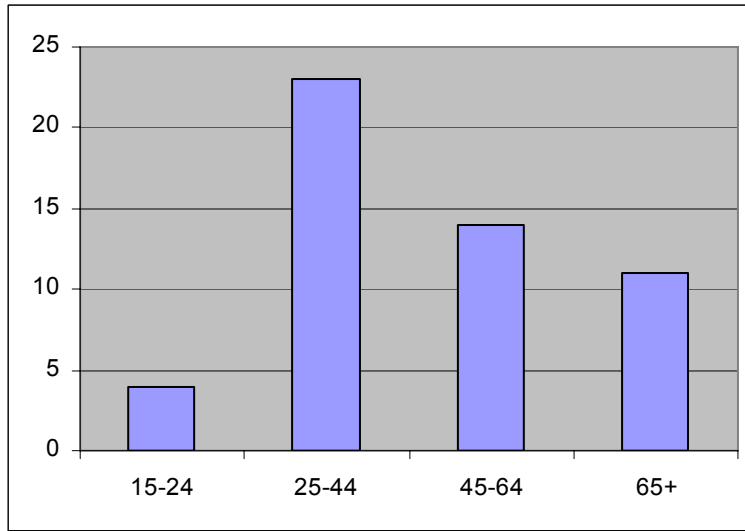
Grafik 1. Hastaların klinik özellikleri.

MOTT olarak tanımlanan izolat ARB negatif, *M. tuberculosis* kompleks izolatlarının 39’ u ARB pozitif, 23’ ü ARB negatif olarak saptanan klinik örneklerden üretilmiştir. Hastaların ARB sonuçları ile dizi analizi sonuçları Tablo V’ te gösterilmiştir.

Tablo V. ARB ile dizi analizi sonuçları.

		ARB		Toplam
		Pozitif n(%)	Negatif n(%)	
Dizi analizi	<i>M. tuberculosis</i> n(%)	39 (62,9)	23 (37,1)	62 (100)
	MOTT n(%)	0	1 (100)	1 (100)
	<i>Nocardia asteroides</i> n(%)	0	1 (100)	1 (100)
Toplam n(%)		39 (60.1)	25 (39.9)	64 (100)

Mikobakteri izole edilen hastalar 19-82 yaşları arasındadır. Olguların yaş dağılımı Grafik 2' de gösterilmiştir:

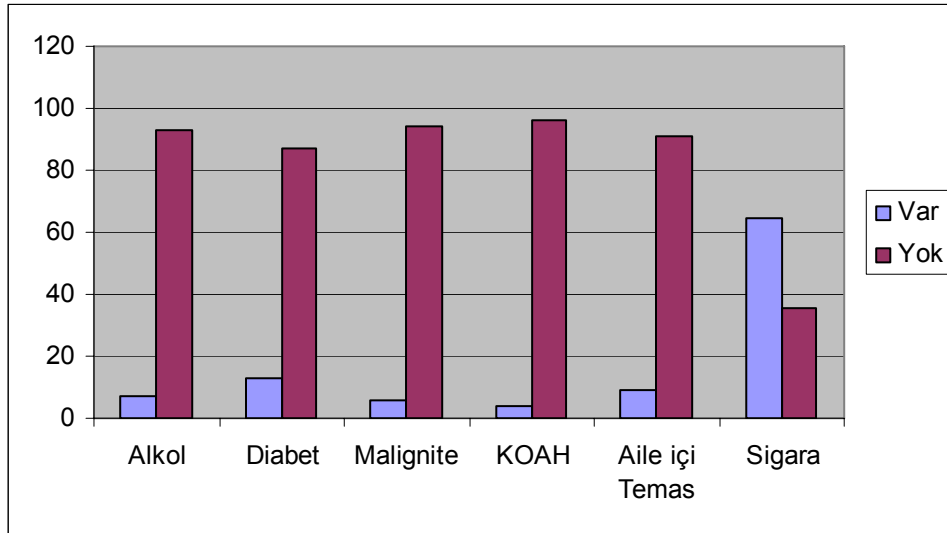
Grafik 2. *M. tuberculosis* tanımlanan hastalarda yaş dağılımı.

Mikobakteri izole edilen 17(%25.4) kadın, 47 (74.6) erkek hastanın dağılımları Tablo VI' da gösterilmiştir.

Tablo VI. Hastaların cinsiyete göre dağılımı

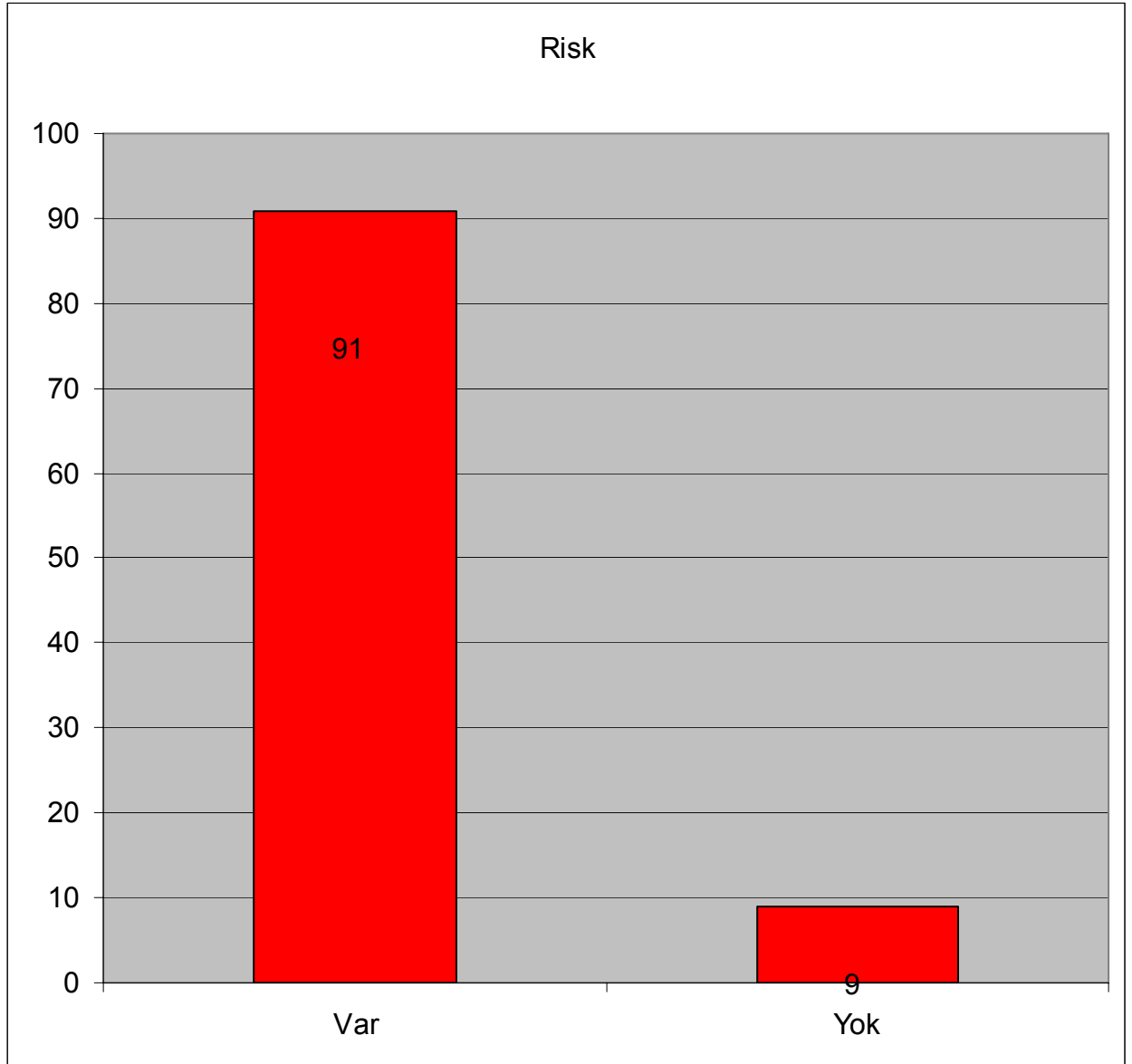
			Cins		Toplam
			Kadın	Erkek	
Dizi analizi	<i>M. tuberculosis</i>	n (%)	16 (25,8)	46 (74,2)	62 (100)
	MOTT	n (%)	1 (100)	0	1 (100)
	<i>Nocardia asteroides</i>	n (%)	0	1 (100)	1 (100)
Toplam		n (%)	17 (26,6)	47 (73,4)	64 (100)

Çalışmaya alınan hastalarda, tüberkülozla ilişkili olabilecek diabetes mellitus, malignite, aile içi temas, sigara ve alkol kullanımını öyküsü içeren risk faktörlerinin dağılımı değerlendirilmiştir.



Grafik 3. Hastalardaki risk faktörleri ve oranları.

Hastalar bu risk faktörlerinden herhangi birisine sahip olanlar ve olmayanlar şeklinde değerlendirilmiştir. Sonuçlar grafik 4' de gösterilmiştir.



Grafik 4. Risk faktörleri olan ve olmayan hastaların karşılaştırılması.

4 TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüberküloz bilinen en eski hastalıklardan olmasına, sebebinin kesin olarak bilinmesine, tedavisinin mümkün olmasına karşın halen dünyada en yaygın ve ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir.

Tüberküloz her yaşta görülür. Gelişmiş ülkelerde tüberküloz görülme yaşı ileri yaşlara doğru kaymakta, gelişmekte olan ülkelerde ise en fazla genç erişkinler bu hastalıktan etkilenmektedir (26). ABD’de 1997 yılındaki tüberküloz olgularının yaşlara göre dağılımı şu şekildedir. 5 yaş altında %3.8; 5-14 yaş %2.6; 15-24 %8.5; 25-44 %34.8; 45-64 %26.7 ve 65 yaş üzerinde %23.6’dır (14,32). Ülkemizde yapılan çalışmalarda tüberküloz olgularının büyük çoğunluğu 25-44, 45-64 yaş grubunda yer almaktadır (18). Çalışmamızdaki tüberkülozlu olgularda yaş dağılımı; 15-24 %6.45, 25-44 %37.1; 45-64 %22.5 ve 65 yaş üzerinde %17.75’ dir. Çalışmamızdaki olguların en sık gelişmiş ülkelerdeki gibi ileri yaşlarda görülmesi, tüberküloz kontrol çalışmaları açısından olumlu bir gelişme olarak düşünülebilir.

Tüberküloz olgu ve ölümleri erkeklerde kadınlardan daha sık görülmektedir. ABD’ deki verilerde 1997 yılında beyazlarda olguların %66’ sı, zencilerde ise %63’ ü erkekti (14,31). Ülkemizde yapılan çalışmalarda tüberküloz hastalarının erkek/kadın oranının 1,5-3,7 arasında değiştiği ve genel olarak gelir ve eğitim durumlarının yetersiz olduğu dikkati çekmektedir (15,18,68,82). Bu oranla uyumlu olarak bizim çalışmamızdaki olguların %26.6’ sı kadın, %73.4’ ü erkek olarak saptanmıştır. Olgular içinde kadınların erkeklere göre düşük oranda bulunması, iki cins arasındaki yapısal farklılıklar dışında, erkeklerin daha fazla sosyal yaşama katılması nedeniyle enfeksiyon risklerinin daha fazla olması veya çeşitli sosyoekonomik nedenlerle kadınların sağlık merkezlerine daha zor ulaşabilmeleriyle açıklanabilir.

Erişkin tip tüberkülozu üç kaynaktan gelişebilir: Primer tüberkülozun progresyonu, ekzojen reenfeksiyon, endojen reaktivasyon (postprimer-sekonder tüberküloz). Erişkin tüberkülozunun

%80' i endojen kaynaklıdır. %87 oranında akciğerlerde, %13 oranında diğer organlarda görülür (26,35,36). Çalışmamızdaki olgularda da en sık akciğer tüberkülozu görülmüştür. 62 olgu akciğer tüberkülozu iken, bir olguda akciğer ile birlikte lenf bezi tüberkülozu ve bir olguda da larinks tüberkülozu vardı.

Normal şartlar altında tüberküloz enfeksiyonundan sonra ilk yıl içinde hastalık gelişme riski %15.2' dir ve daha sonra bu risk giderek azalmaktadır. Enfeksiyonu takiben 30 yıllık bir süreçte gelişen enfeksiyonun %80' i ilk iki yıl içinde görülmektedir (26,35,36).

Tüberkülozun gelişmesine yatkınlık yaratan faktörler genel olarak hastanın lokal reaktivasyonunu önleyen ya da daha önce *M. tuberculosis* enfeksiyonun yayılmasını önleyen bağışıklığı değiştirerek reaktivasyona sebep olmaktadır (26,36) Bu risk faktörleri tüberküloz enfeksiyonu ve aktif hastalık gelişimiyle ilişkilidir.

Tüberküloz enfeksiyonunda en fazla bulaştırmacı olgular, balgamıyla basil çıkaran hastalardır. Hasta ne kadar sık öksürürse bulaşma riski o kadar artar (6,36). Çalışmamızdaki balgam örneklerinden *M. tuberculosis* izole edilen olguların başvuru anındaki şikayetlerinde % 78' inde öksürük mevcuttu ve olguların % 62.9' unda ARB pozitifiti. Hastaların bulaştırmacılığı, etkili tedavi ile 2-3 haftada pratik olarak sona erdiği için, tüberkülozlu hastayı hemen izole etmek ve etkili tedaviye başlamak bu nedenle büyük önem taşımaktadır.

Temasin yakınlığı, bulaşmada temel etkindir. Kültür pozitif hastanın ev teması, iş arkadaşlarına göre 50-60 kat daha fazla risk altındadır (6, 36). Ülkemizdeki bazı çalışmalarda önceden tüberkülozlu hastayla temas öyküsü oranının %5.1-34 arasında olduğu bildirilmektedir. Alataş ve arkadaşları %33 oranında, Demiralay ise %5.5 temas öyküsü bildirmiştir (8,18). Bizim çalışmamızda ise ülkemizdeki verilerle uyumlu olarak aile içi temas %9.1 olarak saptandı.

Aktif tüberküloz hastalığına dönüşümüyle ilgili risk faktörleri; malnütrisyon, alkolizm (risk 10 kat fazla), evsizlik, kapalı ortamlar, kronik debilizan hastalıklar, böbrek yetmezliği, bağışıklık

yetmezliği (AIDS, maligniteler, immunsupresif ilaç kullanımı), yaşlılık (5 yaş altı, adolösan ve 65 yaş üzeri), sigara içimidir. Diabetes mellitusta 3 kat , silikoziste 2,8-30 kat, sigara tiryakiliğinde 2-3 kat, HIV enfeksiyonunda 100-170 kat daha fazla hastalık gelişme riski vardır. Apekte infiltrasyon varlığında ve vücut ağırlığının, ideal vücut ağırlığına göre %5 ve daha fazla düşük olması durumunda hastalığa yakalanma riski artmaktadır (48). Çalışmamızdaki olgular diabetes mellitus, malignite, aile içi temas, sigara ve alkol kullanımını öyküsü içeren risk faktörleri açısından taranmıştır. Olguların %91' inde bu risk faktörlerinden en az biri bulunmaktadır. Bu olgularda risk faktörlerinden en sık, sigara kullanımı (%65) ve diabetes mellitus (%13) yer almaktadır.

Yetişkin akciğer tüberkülozunun erken dönemlerinde hiçbir semptom bulunmayabilir. Fakat lezyonlardaki basil sayısı belirli bir düzeye ulaşınca, özgül olmayan yapısal semptomlar ve solunum sistemi ile ilgili semptomlar ortaya çıkmaya başlar. En sık görülen genel semptomlar, iştahsızlık, yorgunluk, kilo kaybı, öğleden sonraları çıkan ateş ve gece terlemeleridir. Solunum sistemi ile ilgili semptomların varlığı hastalığın ilerlediğini gösterir (35). Çalışmamızdaki *M. tuberculosis* izole edilen olguların başvuru esnasında %78' inde öksürük, %42' sinde balgam, %15' inde hemoptizi, %20' sinde sırt/göğüs ağrısı gibi solunum sistemi ile ilgili semptomları daha fazlayken, iştahsızlık, kilo kaybı, gece terlemesi gibi genel belirtiler daha az oranda yer almıştır.

Tüberkülozdan korunmanın en etkin yolu, hastaların erken tanısı ve tedavisidir. Tüberkülozun ön tanısı klinik verilere dayanmasına rağmen, kesin tanısı bakterinin izolasyon ve tanımlamasına bağlıdır (27).

Boyalı preparatların incelenmesi kolay ve hızlı bir yöntem olmasına karşın düşük duyarlılık oranına sahiptir. Kültür pozitif balgam örneklerinin %50' den azında ARB pozitifliğinin bulunduğu bilinmektedir (27). Çalışmamızda *M. tuberculosis* izole edilen hastaların balgam

örneklerinin %62.9' unda ARB pozitifliği saptanmıştır. ARB negatif olan 23 (%37.1) örnekte ise *M. tuberculosis* tanımlanmıştır. Bu durum yöntemin duyarlılığının düşük olmasına, okuma hatalarına ve örnekteki bakteri sayısına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Kültür yöntemi altın standart olarak kabul edilen yöntemdir. *M. tuberculosis*' in ikiye bölünme süresinin 16-18 saat olması nedeniyle, bakterinin izolasyon ve tanımlaması için besiyerlerin 6-8 hafta gibi uzun süre inkübe edilmesi gereklidir. Bu nedenle, hastalığın kesin tanısını koyduracak duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç alınabilen, kolay uygulanabilir tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Sıvı besiyerleri bu süreyi kısaltmıştır. Bu amaçla *M. tuberculosis* saptanması için gerekli süreyi ortalama 8-18 güne indiren otomatize sistemler geliştirilmiştir. Bunlardan BACTEC 460 TB kültür sisteminde, kültür şişelerinin okutma işlemlerinin otomatize olmaması, çapraz kontaminasyon riskinin bulunması, radyoaktif atıkların birikimi söz konusu olduğundan bu sistemin kullanılabilirliği kısıtlanmaktadır (53). Belirtilen dezavantajlarına rağmen, mikobakterilerin izolasyon sürelerini 10-14 güne indirmesi, tanıda yüksek duyarlılığı, *M. tuberculosis* kompleks ile MOTT izolatlarını birbirinden ayırt edebilmesi, *M. tuberculosis* kompleks üyelerine antitüberküloz duyarlılık testlerinin uygulanabilir olması nedeniyle BACTEC 460 TB kültür yöntemi tüm dünyada altın test olarak kabul görmekte ve yeni geliştirilen kültür yöntemlerinin karşılaştırılmasında standart olarak kullanılmaktadır (9).

Baylan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada BACTEC 460 TB kültür sistemi ile saptanan 104 izolattan 97' si (%93.3), LJ besiyerinden de üretilenmiştir. BACTEC 460 TB kültür sisteminde izole edilen yedi mikobakteri izolatı, LJ kültüründe saptanamamıştır. LJ kültüründe üretilen bir mikobakteri izolatı, BACTEC 460 TB kültür sisteminde izole edilememiştir. Bu durum yöntemin duyarlılığı, özgüllüğü ve örnekteki bakteri sayısına bağlı olabileceği gibi özellikle az sayıda bakteri içeren örneklerde bakterinin örnek içerisinde eşit dağılmaması ile açıklanmıştır (7).

Yan ve arkadaşları MB/BacT and BACTEC MGIT 960 sistemleri ile konvansiyonel besiyerlerini karşılaştırmışlardır. Bütün mikobakteriler için, üreme hızları MB/BacT, MGIT 960 ve katı besiyerlerinde; sırasıyla %91.6, 87.4 ve 54.7 olarak saptanmıştır. Otomatize sistemlerinin her ikisinin de üreme hızı ve saptama zamanı açısından katı besiyerlerinden üstün olduğu belirtilmiştir. Sonuçlar, MB/BacT and BACTEC MGIT 960 sistemlerinin mikobakterileri üretmede hızlı, duyarlı ve etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir (81).

Alp ve arkadaşları, 2098 klinik örnekten 107' sinde BACTEC radyometrik yöntemle *M. tuberculosis* saptamışlardır. *M. tuberculosis*' i saptama açısından; EZN boyama yöntemi ile Cobas Amplicor sistemini, referans yöntem Bactec radyometrik yöntemle karşılaştırmışlardır. EZN boyama yönteminin özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif prediktif değeri; %98.5, %42.9, %62.1 ve %96.9, Cobas Amplicor sisteminin ise bu değerleri sırasıyla %99.3, %67.3, %83.5 %98.4 olarak saptamışlar ve sonuç olarak tüberküloz tanısında mikroskopik inceleme ve amplifikasyon yöntemlerinin mutlaka kültür yöntemleriyle birlikte kullanmak gerektiğini belirtmişlerdir (4).

Hızlı ve konvansiyonel yöntemlerle üretilen mikobakterilerin tanımlanması, mikobakteriyel enfeksiyonların tanısında önemli bir aşamadır ve global tüberküloz kontrolünde kritik bir öneme sahiptir. Çünkü tüberküloz, sadece bir hastanın bireysel hastalığı olmayıp aynı zamanda bir halk sağlığı sorunudur, çünkü kişiden kişiye bulaşmaktadır (46). Hastaların en kısa zamanda tanı konulması ve tedavisi gerekmektedir. Hastalığın oluşumundan %97-99 oranında *M. tuberculosis* sorumludur (36). Bağışık yetmezlikli hasta sayısındaki artış ve tanı yöntemlerindeki gelişmelere bağlı olarak her geçen gün daha fazla sayıda ve türde MOTT hastalık etkeni olarak izole edilmektedir. Son on yılda tanımlanan yeni türlerle bariz bir şekilde artış gösteren MOTT' ların 100' den fazla türü bulunmaktadır. Normalde patojen olmayan bazı MOTT' lar bağışık sistemi

baskılanmış hastalarda özellikle AIDS olanlarda fırsatçı enfeksiyonlara (AIDS'li erişkinlerin %25-50'si ve çocukların %10'unda) neden olurlar (3,10,25).

Günümüzde Runyon gruplandırması bazı eksikliklerine rağmen biyokimyasal deneyler için bir yön belirlemektedir. Üretilen her mikobakteri suşu önce Runyon' un önerdiği dört gruptan birine ayrılır. Biyokimyasal deneylerle gruptaki türlerden hangisi olduğu saptanır. Her mikobakteri suşu için biyokimyasal deneylerin tamamı uygulanmaz. Anahtar deney adı verilen bazı deneyler seçilerek uygulanır. Coğrafik bölgede en sık rastlanılan türlerin pozitif verdiği bilinen deneylere seçimde öncelik verilmesi gerekir. Çalışmamızda mikobakterilerin ön tanımlanması için anahtar test olarak niasin testi uygulanmıştır, ancak doğrulama testi ve negatif çıkanlar için herhangi bir test yapılmaksızın MOTT denilmiştir.

Mikobakteri tür tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal yöntemler zaman alıcı ve emek yoğun işlemlerdir. Bu nedenle mikobakterilerin tanımlanmasında moleküler ve genetik incelemelerin yapılması zorunlu olmuştur (10).

Direkt amplifikasyon testleri olarak da adlandırılan nükleik asit amplifikasyon testleri, *M. tuberculosis* komplekse spesifik bölgeleri çoğaltmak amacıyla düzenlenmiştir. Tüberküloz basillerinin tiplendirilmesi amacıyla sıklıkla kullanılan bölgeler, genom üzerindeki tekrar elementleridir. Bu amaçla kullanılan *IS6110* insersiyon dizisi, *M. tuberculosis* kompleks genomu üzerinde farklı kopya sayılarında bulunan, lokalizasyon bakımından da türler arasında değişim gösteren bir transpozondur (9).

Kivi ve arkadaşları *IS6110* gen bölgesini hedef alan çalışmada örneklerin %64' ünde *M. tuberculosis* kompleks türlerini belirlemişlerdir (34). Warren ve arkadaşları IS-3' probunu ve DNA parmak izi yöntemini kullanarak %99.7 oranında *M. tuberculosis* izolatlarını tanımlamışlardır (75). Durmaz ve arkadaşları *IS6110* ve DNA parmak izi metoduyla yapmış oldukları çalışmada ise, 88 *M. tuberculosis* izolatının 58' ini (%65.9) tiplendirmişlerdir (20).

Ağaçayak ve arkadaşları *M. tuberculosis* izole edilen 105 balgam örneğine ve kültür örneklerine yapılan *IS6110* nested PZR sonucunda, balgam örneklerinin 78' inde (%74.28) ve kültür örneklerinin 84'ünde (%80) *M. tuberculosis* kompleks tanımlanmıştır. Balgamda gerçekleştirilen nested PZR ile kültürde gerçekleştirilen arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Sonuç olarak *M. tuberculosis* kompleks türlerinin nested PZR ile direkt balgam örneklerinden belirlenmesinin, pratik, duyarlı ve özgül bir yaklaşım olduğunu düşünmüşlerdir (1).

Gilman ve arkadaşları önceden 16S rDNA dizi analizi ile tanımlanmış hasta örneklerini SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism Analyses) yöntemi ile test etmişler, SSCP bant paterni bulunan 40 türü tanımlamışlar, 5 organizmayı veri tabanında olmadığı için yeni ya da çok yakın ilişkili tür olarak tanımlamışlardır. SSCP daha çok mutasyonları saptamada kullanılan hızlı, kolay standardize edilen, duyarlı bir yöntem olmasına karşın, özellikle ilk kurulum aşamasında özel ekipman ve malzeme gerektiren, yüksek maliyetli bir yöntem olduğunu ve elektroforez aşamasında değerlendirme için bilgisayar desteği gerektiğini vurgulamışlar. Sonuç olarak henüz sınırlı sayıda mikobakteri türü için yapılan ve dizi analizine alternatif olan SSCP yöntemi ile yapılacak ileri araştırmaların, bütün mikobakteri türlerini kapsayacak veri tabanının oluşmasını sağlayacağını bildirmişlerdir (24).

hsp65 PRA (PCR Restriction Endonuclease Analyses) yöntemi, Telenti ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiş ve 33 PRA paterni tanımlanmıştır. Devallois ve arkadaşları 34 mikobakteri türünde 49 farklı patern saptamışlar, tanı cetveline yeni tür eklemeleri yapmışlardır (19). *hsp65* PRA ile ilgili bilgi ve 70' e yakın mikobakteri türüne ait bant paternlerini içeren veri tabanı bulunmaktadır (57). Birbirine çok yakın ve sayıda olan bant paternlerinin yorumlanması, yaşanan en büyük sıkıntılardan birisidir (59). İlk *hsp65* PZR çalışmalarında bant büyüklüklerinin değerlendirilmesi için bilgisayar desteğinden yararlanılmıştır (57). Devallois ve arkadaşları PRA için çok fazla PZR ürününe gereksinimi olan *M. kansasii* hariç tüm suşlarda, gözle

değerlendirmenin yeterli olduğunu bildirmişlerdir (19). *hsp65* gen bölgesinin olumsuz yönlerinden biri; kullanılan Tb11 ve Tb12 primerlerinin, mikobakteri dışındaki *Nocardia* ve ilişkili genusun *hsp65* genini de çoğaltmasıdır (43).

Cheunoy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *M. tuberculosis*, hızlı ve yavaş üreyen mikobakterilerin *hsp65* ve *rpoB* PRA yöntemi kullanarak tanımlanması biyokimyasal tanımlama ile karşılaştırmış ve uyumlu sonuç yüzdesi; %100, %98.8 ve %83.3 olarak saptamışlardır (11).

Çok sayıdaki mikobakterilerin tür tanımlanması için en duyarlı yöntem; 16S rDNA, ITS bölgesi ile *rpoB*, *hsp65*, *recA* ve *sodA* gibi protein kodlayan hedef genlerin (housekeeping genler) bir kısmının dizi analizini yapmaktır (57).

Patel ve arkadaşları, klinik mikobakteri izolatlarını, 16S rDNA bölgesinin 500 baz çiftlik diziye göre tanımlayan MiqroSeq 500 Bacterial Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) tanımlama sistemini değerlendirmişlerdir. Önceden rutin yöntemlerle tanımlanan 113 izolat bu kit ile tanımlanmış, 93 (%82) izolat önceki tanımlama ile uyumlu, 18 (%16) izolat uyumsuz olarak bulunmuştur. 18 izolatın 7' si fenotipik analiz ya da Accu-probe rDNA hibridizasyon ile hatalı, dizi analizi ile doğru tanımlanmıştır. 18 izolatın 11' i fenotipik yöntemlerle tanımlanması zor olan ve az karşılaşılan türlerdir, biri dışında moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Fenotipik olarak tanımlanamayan iki 2 (%2) izolat, dizi analizi ile kesin olarak tanımlanmıştır. 16S rDNA bölgesinin tamamının, *M. genevansae* ve *M. simiae*, *M.kansasii* ve *M. gastri* türlerinde, *M. tuberculosis* kompleks içinde yer alan türlerde aynı olması ve *M. chelonae* ve *M.abscessus* arasında fark yaratan bölgenin 5' ucunda yer alması nedeni ile bu bölgenin dizi analizi ile bu türlerin ayırt edilemeyeceğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak; fenotipik tanımlama 2-8 hafta sürmekte ve bu süre içerisinde hasta gereksiz veya yetersiz tedavi almaktadır. Ticari prob hibridizasyon hızlı bir tanımlama sağlar, fakat bir testle bir tür çalışılabilir ve sınırlı sayıda tür için prob bulunmaktadır. MiqroSeq 500 yöntemi ise 2 günde tamamlanabilir, hızlı olmasının

yanısıra fenotipik tanımlamaya göre daha doğru tanımlama sağlamaktadır. Bu nedenle mikobakterilerin rutin tanımlanması için kullanılabilir. Aynı zamanda dizi analizinin farklılığı ayırt edebilme gücü fenotipik analizden çok daha iyidir ve dizi analizi ile yeni türler tanımlanabilmektedir (52).

Cloud ve arkadaşları 119 mikobakteri suşunun 16S rDNA dizi analizi (MiqroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit) ile tanımlananların %87' si fenotipik tanımlama (biyokimyasal testler, prob testleri ve HPLC) ile uyumlu bulunmuş, 13' ü uyumsuz olarak saptanmıştır. HPLC' ye göre tek dezavantajı maliyetidir. Dizi analizi ve HPLC maliyeti (\$54 ve \$50) relatif olarak benzerdir. Dizi analizi, tekrarları ve doğrulama testlerini azalttığı için tanımlama zamanını kısaltır ve daha doğru bir tanımlama sağlar. Bu nedenle mikobakterilerin tanımlanması için ideal bir yöntemdir (12).

Bütün mikobakteri türlerinde bulunan *hsp65* geni, 16Sr DNA dizisinden daha fazla değişkendir ve *M. tuberculosis* kompleks üyeleri hariç klinik olarak önemli bütün mikobakterileri ayırt edebilecek yeterli ölçüde dizi farklılıkları içermektedir. Bu nedenle genetik olarak ilişkili türlerin tanımlaması için yararlı olabilir. Bu bölge tür içerisinde de değişkenlik gösterebilmektedir, bu nedenle belirli mikobakteri türlerinin klonlarının ayırt edilmesinde de kullanılmaktadır (19).

McNabb ve arkadaşları, 35 türden oluşan 689 mikobakteri izolatının tanımlanması için, 111 *hsp65* dizisinden oluşan in-house veri tabanını değerlendirmişlerdir. Bu izolatlar, AccuProbe hibridizasyon testi ve doğrulayıcı biyokimyasal testlerle birlikte ile rutin olarak tiplendirilmiştir. İlk değerlendirmede, *hsp65* dizi analizi izolatların %79.4' ünün tanımlamasını doğrulamıştır. Uyumsuz tanımlamalar, en sık *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum* ve *M. terrae* olarak kabul edilen izolatlarda karşılaşılmıştır. Bu izolatların yeniden incelenmesi ile, *hsp65* dizi analizi ile tanımlamaya göre bir 40 izolat daha düzeltilmiş ve bu da *hsp65* dizi analizi ile uyumu %85.2' ye yükseltmiştir. Geriye kalan izolatlar veri tabanında yer alan dizilerle

beklenen uyumu göstermemiştir. Bu da veri tabanının tamamlanmamış olmasına bağlanmaktadır. Bu çalışma *hsp65* dizi analizinin mikobakterilerin tanımlanmasında etkin bir yöntem olması için, geniş bir veri tabanı kurmak gerektiğini göstermiştir (42). *hsp65* dizi analizinin biyokimyasal test panellerine olan üstünlükleri; daha hızlı, daha ucuz olması, hızlı-yavaş üreyenler için aynı ayıracıların kullanılabilmesi ve daha kesin tanımlama sağlamasıdır. 16S rDNA dizi analizine üstünlüğü, daha fazla farklılık içermesi ve 401 nükleotitten daha büyük bir kısmın dizisine ihtiyaç duyulmamasıdır. Ayıracılar ve iş gücü analizi ile, *hsp65* dizi analizi test maliyeti, örnek başına \$30 (U.S. dollars) ve 16S rDNA dizi analizi ile aynıdır. Bu çalışmada ticari prob testlerinin ve doğrulama için yapılan temel biyokimyasal testlerle birlikte tanımlama maliyeti, *hsp65* dizi analizi ile tanımlama ile aynı veya biraz fazladır (42). İnternetteki veri tabanında aynı türe ait çok sayıda dizi veya tanımlanamamış türler bulunmaktadır. Bu da klinik örneklerden mikobakterilerin tanımlanması için, *hsp65* dizi analizi yönteminin rutin olarak kullanılmasına en büyük engel olarak belirtilmiştir (51).

Bizim çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen 64 mikobakteri izolatu, üreme zamanı, koloni morfolojisi ve pigment üretimi değerlendirilerek ve anahtar test olarak niasin testi kullanılarak rutin olarak tanımlanması yapılmıştır. Değerlendirme sonunda *hsp65* dizi analizi, izolatların %98.4' ünün tanımlamalarını doğrulamıştır. Uyumsuz tanımlamalar ise %1.6 olarak bulunmuştur. McNabb ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre, *hsp65* dizi analizi ile tanımlama uyum oranlarımız daha yüksek olarak bulunmuştur. Bunun sebebini bizim çalışmamızdaki izolat sayısının daha az, *M. tuberculosis* oranının çok daha fazla ve diğer çalışmada uyumsuzluğun en sık görüldüğü türler MOTT oranının bizim çalışmamızda çok düşük bulunmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle çalışmamızda uyumsuzluk daha az oranda bulunmuştur. Ön tanımlama ile MOTT olarak saptanan 2 izolat, *hsp65* dizi analizi ile %50 oranında uyumsuz bulundu. İki izolattan birisi *Nocardia* ve diğeri *M. gordonae* olarak

saptandı. Bunun nedeni; çalışmamızda *hsp65* PZR için kullanılan Tb11 ve Tb12 primerleri *Nocardia* gibi yakın ilişkili türleri de çoğaltmaktadır, ayrıca mikobakterilerin ön tanımlanması için anahtar test olarak niasin testi uygulanmış, ancak doğrulama testi ve negatif çıkanlar için herhangi bir test yapılmaksızın MOTT denilmiştir.

Niemann ve arkadaşları, *gyrB* gen bölgesinin 1020 baz çiftlik bölümünün, dizi analizi ve RFLP yöntemleriyle, *gyrB* DNA dizi polimorfizmlerinin *M. tuberculosis* kompleks türlerini ayırım gücünü değerlendirmişlerdir. Dizi polimorfizmlerini daha önceden tarif edilen dört bölgede ve ek olarak bir bölgede daha saptamışlardır. *gyrB* dizisindeki bu farklılıklar *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum* subtip I' in doğru olarak ayırımını sağlar. Diğer türlerin ayırımını kolaylaştıran *gyrB* dizisi, *M. tuberculosis* ve *M. africanum* subtip II' de aynı olduğu için bu türleri ayırt edemez. Ayrıca PZR-RFLP yöntemi ile 3 enzim kullanarak, *M. tuberculosis* kompleks türlerini aynı şekilde ayırt edebilmişlerdir. Sonuç olarak DNA dizi polimorfizmi nedeniyle *gyrB* geninin, dizi analizi veya PZR-RFLP yöntemi ile *M. tuberculosis* kompleks türlerinin ayırımını sağlayan tek marker olduğunu belirtmişlerdir (48).

Bizim çalışmamızda *hsp65* dizi analizi ile *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan 62 izolat, *gyrB* dizi analizi ile *M. tuberculosis* olarak tanımlanmıştır.

Değişik çalışmalardan elde edilmiş verilere göre, MOTT türleri tarafından oluşturulan infeksiyonlar, tüm mikobakteriyel infeksiyonların %1-35'ini oluşturmaktadır. Bu aralığın bu kadar geniş olması, bugüne kadar MOTT infeksiyonlarına çoğu zaman tanı konamamasına bağlanmaktadır (2,7). Çalışmamızda ise bu özellikle uyumlu olarak MOTT oranı %1.6 olarak bulunmuştur.

Ülkemizde mikobakteri türlerinin dağılımına baktığımızda geniş bir aralıkta yer almaktadır.

Ergin ve arkadaşları çeşitli örneklerden izole edilen 102 mikobakteri suşunun *hsp 65* PRA ile kullanarak, 80' i (%78.4) *M. tuberculosis*, 22' si (%21.5) MOTT olarak tanımlamıştır. Bu

çalışmada tür dağılımı *M. gordonae* 14 (%18.2), *M. chelonae* 3 (%13.6), *M. gordonae* III 2, *M. gordonae* IV 2, *M. avium* 2, *M. peregrinum* 2, *M. fortuitum* 1, *M. flavescens* 1, *M. malmoeense* 1, *M. mucogenicum* 1 olarak bildirilmiş, ayrıca farklı reaksiyon paterni gösteren ve literatürde bildirilen tür saptama cetvellerinde yer almayan 3 tür saptanmıştır (21). Bu çalışmadaki MOTT oranları ülkemizde yapılan diğer çalışmalara göre yüksek bulunmuştur.

Baylan ve arkadaşları BACTEC 460 TB sisteminde üretilen 104 mikobakteri izolatını NAP testi ile 102'si (%98.1) *M. tuberculosis* kompleks, kalan ikisi ise MOTT (%1.9) olarak tanımlamıştır. Baylan'ın bahsetmiş olduğu Özekinci ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise tüberküloz şüphesi ile gönderilen 340 örneğin 34'ünde kültürde üreme saptamışlar, 34 mikobakteri izolatının 32'sinin yapılan NAP testi ile *M. tuberculosis* kompleks olduğunu belirlemişlerdir. EZN boyaması ile ise 16 olguda ARB pozitifliği saptamışlardır (7).

Uzun ve arkadaşları BACTEC 12B ve 13A besiyerlerinden izole edilen 92 mikobakteri suşunu, NAP ayırım deneyi ile 81'ini *M. tuberculosis* kompleks, 8'ini *M. fortuitum*, 3'ünü *M. scrofloceum* olarak tanımlamışlardır (83).

Köksalan ve arkadaşları 1203 mikobakteri suşunu biyokimyasal yöntemler, BACTEC NAP testi ve kord oluşumunu değerlendirerek tanımlamışlardır. *M. tuberculosis* oranını %92.9, MOTT oranını %7.1 olarak saptamışlardır. *M. gordonae* (%1.3) en sık rastlanan MOTT türü olarak saptanmıştır (40).

Bizim çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerde %96.8 oranında *M. tuberculosis* saptanmıştır. Bu oran, Köksalan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya daha yakın olmakla birlikte, ülkemizde tür dağılımına ilişkin diğer çalışmalarla uyumlu olarak bulunmuştur. Olgu sayısı çok düşük olduğu için, MOTT %1.6 olarak saptanmıştır. Köksalan ve arkadaşları ile Ergin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, en sık izole edilen MOTT olarak bildirdikleri *M. gordonae*, bizim çalışmamızda izole edilen tek MOTT türüdür.

Sonuç olarak dizi analizi, mikobakterilerin tanımlanmasında referans bir yöntemdir. Tekrarları ve doğrulama testlerine duyulan gereksinimi azalttığı için tanımlama zamanını kısaltmakta, daha doğru ve kesin bir tanımlama yapabilmektedir. Bu durum tüberküloz kontrolü için çok önemli yararlar sağlamaktadır.

Mikobakteri türlerinin doğru tanımlanması sonucunda; olguların en kısa zamanda ve doğru bir şekilde tedavi edilmesi, bu şekilde olası bulaşların engellenmesi veya diğer yandan hastaya yararı olmayan bir ilacın gereksiz kullanılması ve hastanede kalış süresinin uzaması ile oluşabilecek ekonomik kayıpların engellenmesi mümkün olacaktır.

Tedaviye yanıt vermeyen konvansiyonel yöntemlerle *M. tuberculosis* olarak belirlenen türlerin en kısa zamanda kesin bir şekilde tanımlanabilmesi ve tanımlanma doğrulanırsa bu suşların antimikobakteriyel ilaç duyarlılığının, ilaç direncine neden olan mutasyon, delesyon ve insersiyonların saptanması, uygun gen bölgelerinin DNA dizi analizi ile sağlanabilmektedir.

DNA dizi analizi kullanarak tanımlama endikasyonunun doğru konulması gerekmektedir. Yanlış tanımlama nedeniyle oluşan tedavi başarısızlıkları maliyet etki analizi olarak ele alındığında dizi analizi maliyeti ihmal edilir düzeye gelecektir.

Sonuç olarak; tüm mikobakteri suşlarının %96.8' ini *M. tuberculosis* ve sadece %1.6' sını ise MOTT suşlarının oluşturduğu saptanmıştır. Bu çalışma, mikobakterilerin tür dağılımı ile ilgili ülke genelini yansıtacak daha kapsamlı ve standart yöntemlerle yapılmış çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir. Böylece tür dağılımı ile ilgili elde edilen veriler, epidemiyolojik açıdan daha anlamlı olacaktır.

5 ÖZET

Çalışmamızda üreme zamanı, koloni morfolojisi ve pigment üretimi değerlendirilerek ve anahtar test olarak niasin testi ile ön tanımlanması yapılan 64 mikobakteri suşunun, *hsp65* ve *gyrB* gen bölgelerinin dizi analizi ile kompleks ve tür seviyesinde tanımlanması, türlere göre dağılımının saptanması, bu yöntemin laboratuvarımızda rutin kullanıma uygunluğunun saptanması ve toplumumuzdaki mikobakteri tür dağılımı ile ilgili çalışmalara zemin oluşturulması amaçlanmıştır.

Klinik örneklerden izole edilen mikobakteriler, üreme zamanı, koloni morfolojisi ve pigment üretimi değerlendirilerek ve anahtar test olarak niasin testi ile 62' si *M. tuberculosis* ve ikisi MOTT olarak tanımlanmıştır. Ancak *hsp65* dizi analizi ile 62' si *M. tuberculosis* kompleks, iki MOTT izolatının biri *Nocardia asteroides* ikincisi ise *M. gordonae* olarak tanımlanmıştır. Ülkemizdeki diğer çalışmalarla benzer olarak 62 *M. tuberculosis* kompleks izolatının hepsi *gyrB* dizi analizi ile *M. tuberculosis* olarak tanımlanmıştır.

Fenotipik olarak *M. tuberculosis* olarak tanımlananlar, *hsp65* gen bölgesinin dizi analizi ile %98.4 oranında uyumlu olarak saptanmıştır. Uyumsuz tanımlamalar ise %1.6 olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalara göre, *hsp65* gen dizi analizi ile tanımlama uyum oranlarımız daha yüksek olarak bulunmuştur. Bunun sebebini bizim çalışmamızdaki toplam izolat sayısının daha az, *M. tuberculosis* oranının çok daha fazla ve diğer çalışmada uyumsuzluğun en sık görüldüğü türler MOTT oranının bizim çalışmamızda çok az sayıda bulunmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle çalışmamızda uyumsuzluk daha az oranda bulunmuştur. Ön tanımlama ile MOTT olarak saptanan iki izolat, *hsp65* dizi analizi ile %50 oranında uyumsuz bulundu. İki izolattan birisi *Nocardia asteroides* ve diğeri *M. gordonae* olarak saptandı. Bunun nedeni; çalışmamızda *hsp65* PZR için kullanılan Tb11 ve Tb12 primerleri *Nocardia* gibi yakın ilişkili türleri de çoğaltmaktadır, ayrıca mikobakterilerin ön tanımlanması

için anahtar test olarak niasin testi uygulanmış, ancak doğrulama testi ve negatif çıkanlar için herhangi bir test yapılmaksızın MOTT denilmiştir.

Çalışmamızdaki olgularda yaş, cinsiyet, semptomlar, risk faktörleri gibi demografik veriler ile *M. tuberculosis* arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

Semptomlar ve fizik muayene bulguları tüberküloz tanısında yeterli değildir, etkenin en kısa sürede izolasyonu ve tanımlanması şarttır.

Dizi analizi, mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılabilecek güvenilir, hızlı ve tek uygulama ile bütün mikobakterilerin tanımlanmasını sağlayan referans bir yöntemdir.

SUMMARY

Identification in complex and species levels of 64 mycobacterium strains, which were pre-identified by assessment of growth time, colony morphology, and pigment production and using niacin test as a key test, with sequencing of *hsp65* and *gyrB* gene regions, determining the distribution according to species, determining the suitability of this method in our laboratories for routine use, and creating a basis for studies on the distribution of the species of mycobacteria in our population was aimed at in our study.

Sixty-two Mycobacterium isolates obtained from clinical specimens were identified as *M. tuberculosis* and two as MOTT according to growth time, colony morphology, and pigment production, and also using niacin test as the key test. However, 62 isolates were identified with *hsp65* sequencing as *M. tuberculosis* complex, one of the two MOTT isolates were identified as *Nocardia asteroides*, and the remaining one as *M. goodii*. Similarly, in other studies performed in our country, the entire 62 *M. tuberculosis* complex isolates were identified as *M. tuberculosis* with *gyrB* sequencing.

Those identified as *M. tuberculosis* according to phenotypes were determined to be consistent by 98.4% with the sequencing of *hsp65* gene region. Inconsistent identifications were found to be 1.6%. Our identification consistency ratios were higher with *hsp65* gene sequencing as compared to other studies. We believe that the reason for this could be that the total number isolates in our study was smaller, and ratio of *M. tuberculosis* was much greater, and ratio of MOTT, which is the species that inconsistency was more frequent in the other study, was smaller in our study. Inconsistency in our study was smaller in our study with this reason. The two isolates identified as MOTT in the preliminary identification were found to be inconsistent by 50% with *hsp65* sequencing. One of the two isolates was found to be *Nocardia asteroides*, and other to be *M. goodii*. The reason for this could be that Tb11 and Tb12 primers used for *hsp65* PZR in our

study grows some close species like *Nocardia* also. In addition, although niacin test was applied as the key test for the pre-determining of the mycobacteria, no tests were applied for confirmation and those with negative results were identified as MOTT.

The relation of demographical data like age, gender, and symptoms and risk factors with *M. tuberculosis* was evaluated in our study.

Symptoms and physical examination findings do not suffice for a diagnosis of tuberculosis, isolation and identification of the causative organism in the shortest time possible are essential.

Sequencing is a reliable and rapid reference method capable of identifying all the mycobacteria with a single application.

KAYNAKLAR

1. Aaçayak A, Bulut Y, Seyrek A, Gündüz A, Dilek AR. Balgam örneklerinden *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türlerinin nested PZR metodu ile direkt belirlenmesi. *Gülhane Tıp Dergisi* 2006; 48: 75-78.
2. Alcorn TM, Anderson SM (Çeviri. Ustaçelebi Ş, Tekeli A). Otomatize DNA Dizi Analizi. *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamaları*. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006 153-159.
3. Alp A. Non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonlarında laboratuvar tanı ve duyarlılık testleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 2003, Samsun.
4. Alp A, Pınar A, Haşçelik G. Comparison of Cobas Amplicor system and microscopic examination with bactec radiometric method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2004; 38, 3: 193-201.
5. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of Tuberculosis and other mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123: 343–358.
6. Babacan F, Över U. Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* Complex : Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*; İstanbul: Nobel Tıp; 2002; 1675-1690.
7. Baylan O, Kısa Ö, Albay A, Doğancı L. Mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2002 yılında tüberküloz olgularından izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşları ve antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları. *Gülhane Tıp Dergisi*. 2003; 45, 3: 256-262.
8. Bilgehan H: *Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. 10. Baskı, Barış Yayınları, İzmir 2000;439-489.

9. Brunello F, Fvari F, Fontana R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of Mycobacteria from various clinical specimens. J Clin Microbiol 1999; 37: 1206- 1209.
10. Chemlal K, Portaels F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. Curr Opin Infect Dis. 2003, 16 : 77-83.
11. Cheunoy W, Prammananan T, Chaiprasert A, Foongladda S. Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: Two amplified targets *hsp65* and *rpoB*, for identification of cultured Mycobacteria. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 51: 165-171.
12. Cloud L, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY et al. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. J Clin Microbiol, 2002; 40(2): 400-406.
13. Cook JV, Turenne CY, Wolfe J, Pauls R, Kabani A. Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: Cost Analysis. J Clin Microbiol, 2003; 41(3): 1010-1015.
14. Coşkun F, Özyardımcı N. Tüberküloz epidemiyolojisi. Akciğer Arşivi: 2003; 4: 60-63.
15. Çalışır HC, Açıık M, Öğretensoy M, Ökten F. Tüberkülozlu olguların sosyal ve ekonomik koşulları. Solunum Hastalıkları. 1997;8:635-641.
16. Daniel TM, Bates JH, Downes KA. History of Tuberculosis. "Tuberculosis" (Ed. Bloom BR)'de, American Society For Microbiology, Washington DC, 1994; 13-23.
17. Davies PDO. Tuberculosis and migration. Eur Respir Mon 1997; 4: 68-87.
18. Demiralay R. Isparta' da Tüberkülozun bazı epidemiyolojik özelliklerindeki değişimler. Tüberküloz ve Toraks, 2000; 48(3): 219-226.

19. 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: 2969-2973.
20. Durmaz R, Özerol YH, Durmaz B, Gürel S, Şenoğlu A, Evliyaoğlu E. Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. Microb Drug Resist 2003; 9: 361-366.
21. Ergin A, Kocagöz T, Us D, Günalp A. Polimeraz zincir reaksiyonu - restriksiyon enzim analizi ile mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması. Mikrobiyoloji Bülteni 1999;33(4): 251 - 261.
22. Fourth report of the cooperative open ended study of slowly growing mycobacteria of the international group on mycobacterial taxonomy. Int J Syst Bacteriol. 41: 463 - 472.
23. Gantwell MF, Snider DE, Cauthen GM, Onorato IM. Epidemiology of tuberculosis in the United States 1985 through 1992. JAMA 1994; 272: 535-539.
24. Gillman LM, Gunton J, Turenne CY. Identification of mycobacterium species by multiple fluorescence PCR single stranded conformation polymorphism analyses of the 16s rRNA gene. J Clin Microbiol 2001; 39: 3085-3091.
25. Gingeras TR et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. Genome Res. 1998; 8: 435-448.
26. Haas DW. *Mycobacterium tuberculosis*. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R,(eds). Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5.ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000; 2576-2607.

27. Haifets L, Desmond E. Clinical Mycobacteriology Laboratory In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR(Eds). Tuberculosis and The Tubercle Bacillus. ASM Press 2005: 49-69.
28. Huard RC, Fabre M, Haas P, Claudio L, Lazzarini, Soolingen DV, Cousins D, Ho JL. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. J Bacteriol, 2006; 188(12): 4271-4287.
29. Iadernaco MF, Castro KG. Epidemiology of tuberculosis. Semin Respir Infect, 2003; 18(4): 225-240.
30. Ilstrup DM. Statistical methods in microbiology. Clin Microbiol Rev 1990; 3: 219-226.
31. Iseman M. Antituberculosis drug resistance in the world "The WHO/ IUATLD Global Project on the Antituberculosis Drug Resistance Surveillance" 1997; 13, 63-72.
32. Iseman M. (Çeviri: Özkara Ş). Klinisyenler İçin Tüberküloz Kılavuzu. Ankara Nobel Tıp Kitabevi. 2002:97-125.
33. Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing *Mycobacteria* by their *gyrB* sequences. J Clin Microbiol, 2000, 38(1): 301-308.
34. Kivi M, Liu X, Raychaudhuri S, Altman RB, Small PM. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequences with a whole-genome microarray: IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002; 40: 2192-2198.
35. Kıyan M: Mycobacteriaceae. Ustaçelebi Ş, Cengiz TA(Eds). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara. 1999; 419-456.
36. Kocabaş A. Akciğer Tüberkülozu: (Ed)Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, İstanbul: Nobel Tıp; 2002; 530-591.

37. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Mycobacteria In: (Eds.) Koneman EW, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas And Textbook of Diagnostic Microbiology, Philadelphia, Lipincott; 2006:1090-1124.
38. Köksal F, Durmaz R (ed), Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2001:15-34
39. Köksal F. Mikobakterilerin Evrimi. 6.Ulusal Mikobakteri Sempozyumu 23-25 Kasım 2006, Ankara .
40. Köksalan OK, Aydın MD, Eraslan S, Bekiroglu 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 2002; 21:314–317.
41. Kremer K, Van Solingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol. 1999; 37(8): 2607-2618.
42. McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, Black WA, Renton JI. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources. J Clin Microbiol. 2004; 42(7): 3000-3011.
43. Metchock BG, Nolte FS. Mycobacterium In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds). Manual of Clinical Microbiology. Washington ASM: 1995, 400-437.
44. Morgan MA, Doerr KA, Hempel HO, Goodman NC, Roberts GD. Evolution of the p-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropriophenone for identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. J Clin Microbiol. 1985, 21: 634-635.

45. Murray P, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA (Ed). *Mycobacterium*. In *Medical Microbiology*. St Louis, Missouri, 2002, 366-377.
46. Nahid P, Pai M, Hopewell CP. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Proc Am Thorac Soc*. 3: 103-110, 2006.
47. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; Tentative Standard-Second Edition NCCLS Document.
48. Niemann S, Harmsen D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38, 9: 3231–3234.
49. Niemann S, Richter E, Rüsç-Gerdes S. Differentiation among members of the *mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. Bovis*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1): 152–157.
50. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye’ de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı, Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Ankara, 2003.
51. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006; 6, 3:423-432.
52. Patel JB, Leonard GB, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I. Sequence Based Identification of mycobacterium species using the Microseq 500 16Sr DNA Bacterial Identification System. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1):246-251.
53. Piersimoni C, Scarparo C, Cichero P, Pezzo M, Covelli I, Gesu G, Nista D, Scagnelli M, Mandler F. Multicenter evaluation of the MB-Redox medium compared with radiometric BACTEC system, mycobacteria growth indicator tube (MGIT), and Lowenstein-Jensen

- medium for detection and recovery of acid-fast bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 293-299.
54. Rıska PF, Jacobs WR, Bloom BR, Mckitrick J, Chan J: Specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* with the luciferase reporter mycobacteriophage: use of p-nitro-a-acetylamino-b-hydroxypropionophenone. *J Clin Microbiol*, 1997; 35(12): 3225-3231.
 55. Richter E, Rüşch-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the genotype mycobacterium assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(5): 1769-1775.
 56. Richter E, Weizenegger M, Fahr AM, Rüşch-Gerdes S. Usefulness of the genotype mtbc assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 2004; 42 (94): 4303-4306.
 57. Rocha AS, Leite CC, Torres HM, Miranda AB et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. *J Clin Microbiol*, 1999;37(3): 223-229.
 58. Rota S. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler ve *Mycobacterium leprae*: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul, Nobel Tıp; 2002; 1691-1697.
 59. Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt M, Habicht M, Fischer M, 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*. 2000; 38(3): 1094–1104.
 60. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmoner disease. *Med. Clin. N. Am.* 1959; 43: 273-290.

61. Sarma Z, Kaufman L, Bechor J, Bahar J. Comparative study of three culture systems for optimal recovery of mycobacteria from different clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000; 19: 750-754.
62. Scarparoa C, Piccolia P, Rigona A, Ruggieroa G, Ricordia P, Piersimoni C. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 in comparison with BACTEC 460 TB for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 157-161.
63. Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Timothy E et al. Tuberculosis in the AIDS Era. *Clin Microb Rev* 1995; 8: 180-199.
64. Shamputa IC, Rıgouts L and Portaels F. Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens . *APMIS* 2004; 112: 728-752.
65. Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin. Microbiol Infect Dis* November 1994; 13(11): 884-901.
66. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chemist* 2001; 47(5): 809-814.
67. Springer B, Stockman L, Teschner K, Glenn D, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 2296-2303.
68. Şenyiğit A, Işık R, Coşkunsel N ve ark. Akciğer tüberkülozlu 441 vakanın retrospektif olarak incelenmesi. *Solunum Hastalıkları*, 1997; 8: 203-215.
69. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 175-178.

70. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: The new *Mycobacteria* of the 1990's. *Clin Microbiol Rev*, 2003; 16 (2): 319 - 354.
71. Tsukamura M, Kita N, Shimoide H, Arakawa H, Kuze A. Studies the epidemiology of nontuberculous mycobacteriosis in Japan. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 137: 1280-1284.
72. Tsukamura M. Relationship between photochromogenicity and test temperature in *Mycobacteria*. *J Clin Microbiol*. 1981; 14: 225-226.
73. Wallace RJ,. Silcox VA, Tsukamura M, Brown BA, Kilburn JO, Butler WR, Onyi G. Clinical significance, biochemical features and susceptibility patterns of sporadic isolates of the mycobacterium *chelonae*-like organism. *J Clin Microbiol*. 1993; 1: 3231–3239.
74. Wallace RJ, Swenson JM, Silcox VA, Good RC, Tschen JA, Stone MS. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Rev Infect Dis* 1983; 5:657–679.
75. Warren RM, Spuy GD, Richardson M et al. Evolution of the IS6110-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1277-1282.
76. Wayne LG, Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1992; 5: 1-25.
77. Watterson SA, FA Drobniowski. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *J Clin Pathol* 2000; 53: 727-732.
78. WHO Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing Communicable Diseases, World Health Organization, Geneva: 2002. WHO/CDS/TB/2002, 295.
79. World Health Organization 2000, Tuberculosis. WHO Fact Sheet No. 104, Revised August 2002. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
80. World Health Organization Tuberculosis Programme: Framework For Effective Tuberculosis Control, 1994. WHO/TB/94,179.

81. Yana JJ, Huang A, Tsai S, Kob W, Jina Y, Wu J. Comparison of the MB/Bact and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens Diagn Microbiol Infect Dis, 2000;37:25-30.
82. Yarkin T. Yayma pozitif akciğer tüberkülozlu hastaların yaşam koşulları ve tanı sürecinin değerlendirilmesi. Solunum 2003; 5; 30-36.
83. Uzun M, Erturan Z, Anđ Ö. *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksi Suşlarının erken tanısında kord oluşumunun değeri. Klimik Dergisi 2000; (13): 27-29.

ÖZGEÇMİŞ

19 Mayıs 1969’ da Sivas’ da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi 1976 - 1987 yılları arasında Sivas’da tamamladım. Tıp eğitimimi ise 1988 - 1994 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi’ nde tamamladım. 1994 - 2002 yılları arasında Sivas ve Tokat ilinde sağlık ocağı, Verem Savaş Dispanseri ve Ana Çocuk Sağlığı Merkezi birimlerinde pratisyen hekim olarak görev yaptım. 2002 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak uzmanlık eğitimine başladım.