

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ATİPİK MİKOBAKTERİLERİN “LINE PROBE ASSAY” (LiPA) YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI

IDENTIFICATION OF ATYPICAL MYCOBACTERIA ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS BY LINE PROBE ASSAY (LiPA)

**Can BİÇMEN¹, Meral COŞKUN¹, Ayрыз T. GÜNDÜZ¹, Güneş ŞENOL¹
A. Kadri ÇIRAK², Gültekin TİBET²**

ÖZET: Bu çalışmada, İzmir Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Kasım 2004 ve Haziran 2006 tarihleri arasında tüberküloz ön tanılı hastalara ait çeşitli hasta örneklerinden izole edilen atipik mikobakteri suşlarının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli ters hibridizasyon yöntemiyle (INNO-LiPA Mycobacteria v2, Innogenetics NV, Belçika) tanımlanması amaçlanmıştır. Çalışmaya toplam 9660 hastadan elde edilen 21060 örnek dahil edilmiştir. Dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemi sonrasında, örneklerin kültürü otomatize MGIT Bactec 960 sistemiyle yapılmış ve üreme saptanan 4532 (%21.5) örnekte atipik mikobakterilerin tanımlanması NAP testi ile Bactec 460 sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Atipik mikobakteri üremesi saptanan kültürlerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, mikobakteri 16S-23S rRNA “spacer” bölgesine özgü primerler kullanılarak PCR yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen biotinlenmiş PCR ürünü, nitroselülöz şeritler üzerinde mikobakteri türlerine özgü “prob”larla üretici firmanın önerilerine göre hibridize edilerek değerlendirilmiştir. Ayrıca, tanımlanamayan mikobakteri türlerinin tanımlanması için farklı bir ticari kitin iki ayrı versiyonu [GenoType Mycobacterium ve GenoType Mycobacterium AS (Additional Species), Hain Lifescience, Almanya] kullanılmıştır. Çalışmanın yapıldığı dönemde, 30 hastaya ait 44 (%1) solunum yolu örneğinde (balgam, bronş aspirasyon sıvısı, bronkoalveoler lavaj) 10 farklı atipik mikobakteri türü tanımlanmıştır. Onüç hastada farklı günlerde alınan örneklerde yineleyen üreme saptanırken, 17 hastada tek örnekte veya aynı gün alınan farklı örneklerde atipik mikobakteri üremesi gözlenmiştir. Hastalarda saptanan *Mycobacterium* türlerinin dağılımı; *M. fortuitum*-*M. peregrinum* kompleks (n=5), *M. intracellulare* (n=4), *M. avium* kompleks (n=4), *M. chelonae* kompleks (n=4), *M. gordonae* (n=4), *M. kansasii* (n=3), *M. szulgai/intermedium* (n=2), *M. simiae* (n=1) ve *M. scrofulaceum* (n=1) olarak bulunmuştur. INNO-LiPA ve GenoType MTBC ile tanımlanamayan dört örnekten ikisi GenoType Mycobacterium AS ile *M. szulgai/intermedium*, iki örnek ise atipik mikobakteri türü (*Mycobacterium* spp.) olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, hastanemizdeki etken olarak izole edilen atipik mikobakteri sıklığının yüksek düzeyde olmadığı, bununla birlikte tür tanımının tedavinin planlaması açısından faydalı olacağı düşünülmüştür. Atipik mikobakteri tanısında NAP testi sonrasında

¹ Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir. (cbicmen@yahoo.com)

² Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Servisi, İzmir.

INNO-LiPA ve GenoType Mycobacterium testlerinin kullanışlı testler olduğu belirlenmiş, ancak bu testlerle tanımlanamayan türler için GenoType Mycobacterium AS testinin yararlı olabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Atipik mikobakteri, LiPA, polimeraz zincir reaksiyonu temelli ters hibridizasyon.

ABSTRACT: The aim of this study was the identification of atypical mycobacteria isolated from various samples of patients prediagnosed as tuberculosis between November 2004 and June 2006 by a commercial polymerase chain reaction (PCR) based reverse hybridization kit (INNO-LiPA Mycobacteria v2, Innogenetics NV, Belgium). A total of 21060 samples obtained from 9660 patients were included to the study. After decontamination and homogenization processes, the samples were cultivated in automated MGIT Bactec 960 system and the diagnosis of atypical mycobacteria was performed in 4532 (21.5%) culture positive samples with NAP test by using Bactec 460 TB system. After DNA isolation, PCR method was performed by using the primers specific for mycobacterial 16S-23S spacer region. PCR products were then hybridized with the probes specific for *Mycobacterium* species on nitrocellulose strips according to the recommendations of the manufacturer and evaluated. Additionally, two different versions of another commercial Line Probe Assay (LiPA) kit [GenoType Mycobacterium and GenoType Mycobacterium AS (Additional Species), Hain Lifescience, Germany] were used for the detection of unidentified mycobacterial strains. In our study period, 10 different *Mycobacterium* species were identified from 44 (1%) respiratory tract samples (sputum, bronchial aspiration fluid, bronchoalveolar lavage) belonging to 30 patients. While repeated atypical mycobacterial growth was found in 13 patients on different days, 17 patients showed atypical mycobacterial growth only in one sample or in separate multiple samples taken within the same day. The species distribution among patients were as follows; *M.fortuitum*-*M.peregrinum* complex (n=5), *M.intracellulare* (n=4), *M.avium* complex (n=4), *M.chelonae* complex (n=4), *M.gordonae* (n=4), *M.kansasii* (n=3), *M.szulgai/intermedium* (n=2), *M.simiae* (n=1) and *M.scrofulaceum* (n=1). Two of four samples which were unidentified by INNO-LiPA and GenoType MTBC were identified as *M.szulgai/intermedium* by GenoType Mycobacterium AS and the other two were found as unidentified atypical mycobacteria (*Mycobacterium* spp.). As a result, the frequency of atypical mycobacteria isolated in our hospital was thought to be low, however, species-level identification might be useful for the planning of therapy in such patients. In addition, after NAP test, INNO-LiPA and GenoType Mycobacterium were useful tests in microbiological identification of atypical mycobacteria, and GenoType Mycobacterium AS test could be applied in mycobacterial strains which were not identified by the former assays.

Key words: Atypical mycobacterium, LiPA, polymerase chain reaction based reverse hybridization.

GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis dışındaki mikobakteriler, NTM (non-tuberculous mycobacteria), MOTT (Mycobacteria other than *M.tuberculosis*) veya atipik mikobakteriler olarak adlandırılmaktadır^{1,2}. Birçoğu toprakta, suda, toz taneciklerinde, evcil veya vahşi hayvanlarda, sütte ve diğer besin maddelerinde bulunmaktadır¹⁻³. İnsanlara çevreden bulaşabilirler veya vücut yüzeyi ve sekresyonlarında kolonize olabilirler. Yetmişden fazla mikobakteri türü

tanımlanmasına rağmen, göreceli olarak az bir bölümü insan ve hayvanlar için patojendir¹⁻⁴. *M.tuberculosis* (MTB) kompleks suşları dünyada hala mikobakteri enfeksiyonlarının çoğunluğundan sorumlu olmasına rağmen, tüberküloz dışı mikobakterilere bağlı fırsatçı enfeksiyonlar immün sistemin zayıfladığı AIDS gibi enfeksiyonların veya sistemik bozuklukların bir sonucu olarak artış göstermektedir^{1,4,5}. Mikobakteri türleri arasında, sıklıkla NTM enfeksiyonlarında *M.avium*-*M.intracellulare* kompleks, *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.kansasii* ve *M.xenopi* bildirilmektedir¹⁻⁶. *M.gordonae* genellikle insanda enfeksiyon oluşturmamakla birlikte klinik örneklerden kontaminant olarak izole edilmekte ve patojen türlerden ayırımı, tanı açısından önem taşımaktadır^{2,4,6,7}.

Uzun yıllar mikobakterilerin mikrobiyolojik tanımlaması geleneksel biyokimyasal testler ile yapılmaya çalışılmıştır^{1,2,8}. Bu testler gerek emek yoğun olmaları, gerekse sık karşılaşılan atipik mikobakterilerin çoğunun tanımlanmasında yetersiz kalmaları nedeniyle etkin olarak kullanılamamışlardır¹. Son yıllarda, otomatize sistemlerin geliştirilmesi ve klasik yöntemlerin otomatize sistemlere uyarlanması ile MTB kompleks ve MTB kompleks dışı atipik mikobakterilerin (MOTT) ayırımı, örnek kapasitesi yüksek tüberküloz laboratuvarlarında daha etkin olarak yapılabilmektedir^{4,8,9}. Bugün atipik bakterilerin ayırımında en sık ve güvenilir olarak kullanılan test NAP (p-nitro- α -acetyl amino- β -hydroxypropio phenone) testidir^{1,2,8-10}. NAP, kloramfenikol sentezinde ara bileşik olan bir antimikobakteriyel ajan olup MTB üremesini seçici olarak inhibe etmektedir. Atipik mikobakteri ayırımında Bactec 460 sistemi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, önceden NCCLS) tarafından onaylanmış ve altın standart olarak kabul edilmiştir^{9,10}. Bu testin ardından atipik mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması için moleküler yöntemler kullanılmaktadır^{1,4,11,13}.

Bu çalışmada, tüberküloz ön tanılı hastalardan alınan çeşitli örneklerden izole edilen atipik mikobakteri suşlarının, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli ters hibridizasyon mekanizmasına dayalı ticari bir "Line Probe Assay" kiti kullanılarak tanımlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, İzmir Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Kasım 2004 ve Haziran 2006 tarihleri arasında tüberküloz ön tanılı 9660 hastadan alınan 21060 örnek dahil edildi. Örnekler, dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemi sonrasında, otomatize MGIT 960 sistemi (BD Biosciences, ABD) ile kültüre alındı ve üreme saptanan 4532 (%21.5) örnekte atipik mikobakteri tanısı NAP testi ile Bactec 460 sistemi (BD Biosciences, ABD) kullanılarak yapıldı. Atipik mikobakteri üremesi saptanan kültürlerden DNA izolasyonu sonrasında, mikobakteri 16S-23S rRNA "spacer" bölgesine özgül öncüller (primerler) kullanılarak PCR yapıldı. Elde edilen biotinlenmiş PCR ürünü nitroselülöz şeritler üzerinde mikobakteri türlerine özgül "prob"larla üretici firmanın (INNO-LiPA Mycobacteria v2, Innogenetics NV, Belçika) önerilerine göre hibridize edildi ve kolorimetrik olarak görüntülenerek

değerlendirildi. Ayrıca, tanımlanamayan mikobakteri türlerini tanımlamak amacıyla, farklı bir ticari kitin iki ayrı versiyonu [GenoType Mycobacterium ve GenoType Mycobacterium AS (Additional Species), Hain Lifescience, Almanya] kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmanın gerçekleştirildiği dönemde, laboratuvar veya çevre kaynaklı kontaminasyon olduğu düşünülen isolatlar dışarıda bırakılarak 30 hastaya ait 44 (%1) solunum yolu örneğinin (balgam, bronş aspirasyon sıvısı, bronkoalveoler lavaj) kültüründe üreyen 10 farklı atipik mikobakteri türü tanımlanmıştır. Onüç hastada farklı günlerde alınan örneklerde yineleyen üreme saptanırken, 17 hastada tek örnekte veya aynı gün alınan farklı örneklerde atipik mikobakteri üremesi gözlenmiştir. Hastalardan izole edilen mikobakteri türleri Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I. Hastalardan (n=30) İzole Edilen Mikobakteri Türleri

Mikobakteri Türü	Sayı (%)
<i>M.fortuitum-M.peregrinum</i> kompleks	5 (16.7)
<i>M.intracellulare</i>	4 (13.3)
<i>M.avium</i> kompleks	4 (13.3)
<i>M.chelonae</i> kompleks	4 (13.3)
<i>M.gordonae</i>	4 (13.3)
<i>M.kansasii</i>	3 (10)
<i>M.szulgai/intermedium</i>	2 (6.7)
<i>Mycobacterium</i> genus	2 (6.7)
<i>M.simiae</i>	1 (3.3)
<i>M.scrofulaceum</i>	1 (3.3)

INNO-LiPA ve GenoType MTBC ile tanımlanamayan dört örnekten ikisi GenoType Mycobacterium AS ile *M.szulgai/intermedium*, iki örnek ise atipik mikobakteri türü (*Mycobacterium* species; %6.7) olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda, INNO-LiPA ve GenoType MTBC testlerinin performansları aynı bulunmuş, tanımlanamayan iki örnek GenoType Mycobacterium AS ile tanımlanabilmiştir. LiPA kitlerine göre tanımlanan mikobakteri türleri Tablo II'de, atipik mikobakterilere ait LiPA paternleri ise Şekil 1'de görülmektedir.

TARTIŞMA

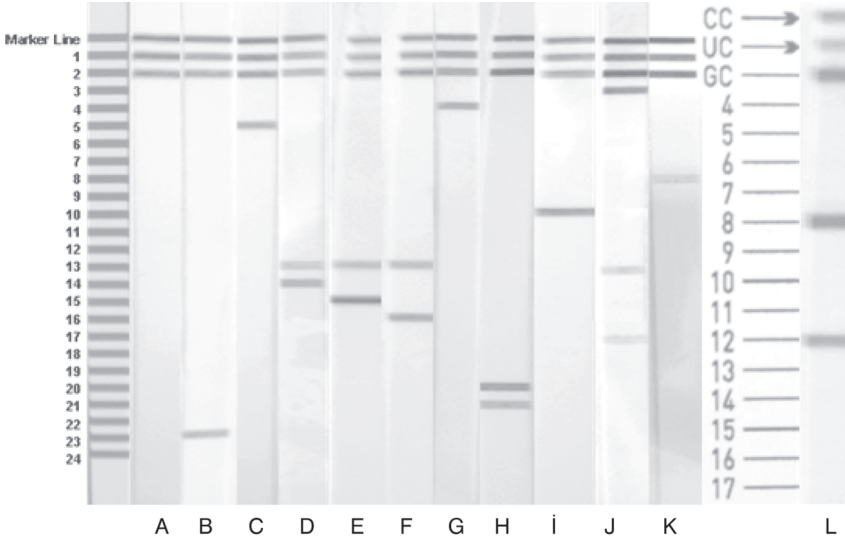
Atipik mikobakteriler doğada yaygın olarak bulunmalarına karşın, insan için potansiyel patojen olabilen türleri belirli coğrafi bölgelerde daha sık görülme eğilimindedir^{1,4}. Değişik çalışmalardan elde edilmiş verilere göre, NTM türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonlar, tüm mikobakteriyel enfeksiyonların %0.5-35'ini oluşturmaktadır^{1,6}. Atipik mikobakteriler, başlıca pulmoner enfeksiyonlar, lenfadenitler, disemine enfeksiyonlar, lokalize deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, tendon-kemik-eklem enfeksiyonları ve kateter enfeksiyonlarına neden olmaktadır⁶. Bölgesel farklılıklar olmakla birlikte, erişkinlerde kronik bronkopulmoner hastalıklarda en sık saptanan etkenler *M.avium* kompleks

Tablo II. LiPA Kitleri ile Tanımlanan Mikobakteri Türleri

LiPA kiti	Tanımlanan Mikobakteri Türleri
Inno-LiPA Mycobacteria v2	<i>Mycobacterium</i> genus, <i>M.tuberculosis</i> kompleks, <i>M.xenopi</i> , <i>M.gordonae</i> , <i>M.marinum</i> / <i>M.ulcerans</i> , MAIS (<i>M.malmoense</i>), <i>M.avium</i> (<i>M.paratuberculosis</i> , <i>M.silvaticum</i>), <i>M.intracellulare</i> , <i>M.scrofulaceum</i> , <i>M.chelonae</i> kompleks (<i>M.abscessus</i>), <i>M.fortuitum</i> - <i>M.peregrinum</i> kompleks
GenoType Mycobacterium CM*	<i>M.interjectum</i>
GenoType Mycobacterium AS**	<i>M.mucogenicum</i> , <i>M.goodii</i> , <i>M.lentiflavum</i> , <i>M.heckeshornense</i> , <i>M.szulgai</i> / <i>M.intermedium</i> , <i>M.phlei</i> , <i>M.gastri</i> , <i>M.asiaticum</i> , <i>M.shimodei</i>

* Inno-LiPA Mycobacteria v2 ile tanımlanan türlere ek olarak GenoType Mycobacterium CM ile tanımlanabilen *M.interjectum* ikinci sütunda gösterilmiştir.

** İlk iki kit ile tanımlanamayan GenoType Mycobacterium AS ile tanımlanabilen mikobakteri türleri ikinci sütunda gösterilmiştir.



Şekil 1. Atipik mikobakterilere ait LiPA paternleri (A-K arasındaki paternler INNO-LiPA Mycobacteria v2 ile, L şeridindeki patern ise GenoType Mycobacterium AS ile elde edilmiştir).

A) *Mycobacterium* genus; B) *M.fortuitum*-*M.peregrinum* kompleks; C) *M.kansasii* grup II; D) *M.avium*; E) *M.intracellulare* (serovar Mac-A); F) *M.intracellulare* (ser. Min-A, -B, -C, -D); G) *M.kansasii* grup I; H) *M.chelonae* kompleks (*M.abscessus*); İ) *M.simiae*; J) MTB-*M.scrofulaceum*; K) *M.gordonae*; L) *M.szulgai*/*M.intermedium*.

(MAC), *M.kansasii* ve *M.abscessus*'dur⁶. Atipik mikobakteri enfeksiyonlarının tanısı, aside dirençli boyama yöntemi ile konamamakta, bu tip hastalara klasik antitüberküloz ilaçlar başlandığında etkisiz olmaktadır. Bu durum, ilacın gereksiz yere kullanımına ve hastanede yatış süresinin uzamasına neden olmakta ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Günümüzde moleküler yöntemler, atipik mikobakterilerin hızlı ve kesin tanısı ile etkin ve özgül bir antimikobakteriyel tedavi için yol gösterici olmaktadır^{1,4,13}. Bu yöntemler, mikobakteri türleri arasında farklılık gösteren gen bölgelerinin çoğaltılması esasına dayanır ve hedef olarak seçilen başlıca gen bölgeleri 16S rRNA, *hsp65*, *recA* ve *rpoB* genleridir^{1,4,12-14}. Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemler arasında Roche Amplicor, Gen-Probe Accuprobe, PCR-RFLP (restriction length polymorphism) ile 65-kDa ısı şok proteininin saptanması ve DNA dizi analizi sayılabilir^{4,12-15}. Hastanemizde yapılan bir çalışmada, nükleik asit amplifikasyon yönteminin geleneksel biyokimyasal yöntemlere göre mikobakteriyel tiplendirmede daha kesin sonuç verdiği bildirilmiştir¹¹.

Son yıllarda PCR temelli ters hibridizasyon (PCR based reverse hybridization; LiPA) testleri kullanıma girmiş ve bu testler aynı anda yirmiden fazla atipik mikobakterinin tanımlanabilmesini mümkün kılmıştır. LiPA yöntemi, biyotinlenmiş mikobakteriyel 16-23S rRNA "spacer" bölgesinin bir nitroselüloz membran şerit üzerinde karşılık gelen oligonükleotidlerle ters hibridizasyonunu ve daha sonra kolorimetrik olarak bu tepkimenin görünür hale getirilmesine dayanır. Bu sistem, birçok mikobakteri türünü ve MTB kompleks, *M.avium*-*M.intracellulare* kompleks ayrımını ve sıklıkla izole edilen *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.chelonae* grubu, *M.gordonae*, *M.xenopi* ve *M.scrofulaceum* gibi mikobakterileri de saptayabilmektedir (Tablo II). Bu sistemin rutin kullanımının değerlendirildiği bir çalışmada, tanımlama sonuçlarının geleneksel yöntemler ve HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ile mikolik asit analizi sonuçlarıyla uyum gösterdiği ve bu yöntemin mikobakteri tanımlamasında doğru, güvenilir ve hızlı bir yöntem olduğu ifade edilmiştir¹³. Mijs ve arkadaşlarının¹² çalışmasında da, ticari INNO-LiPA Mycobacteria testinin performansı araştırılmış ve LiPA sonuçları geleneksel biyokimyasal testler ve diğer moleküler yöntemler ile karşılaştırılmıştır. Beş farklı klinik laboratuvarında toplam 669 izolata araştırıldığı bu çalışmada, LiPA yönteminin diğer testlerle uyumu %99.2, özgüllük ve duyarlılığı ise %100 olarak bildirilmiştir¹². Yam ve arkadaşları ise¹⁵, 16S rRNA dizi analizinin yüksek maliyetine rağmen, diğer yöntemlere göre daha kısa sürede (4-5 gün) ve daha kesin sonuçlar verdiğini ve ayrıca AccuProbe hibridizasyon ve geleneksel yöntemler ile tam bir uyum gösterdiğini bildirmişlerdir.

Günümüzde moleküler yöntemler, Bactec MGIT 960 ve Bactec 460 gibi otomatize sistemlerle mikobakterilerin üretilmesinin ardından atipik mikobakterilerin tanımlanması amacıyla kullanılmaktadır⁹. Miller ve arkadaşları⁴ LiPA Mycobacteria yöntemini, pozitif Bactec 12B sıvı besiyerinden mikobakteri suşlarının tanımlanması amacıyla kullanmışlar ve testin kullanımının kolay, değerlendirmenin çelişkiye yer vermeyecek şekilde (pozitif bantların açık ve net oluşması nedeniyle) olduğunu belirtmişlerdir.

Bir başka çalışmada ise, direk olarak örneklerden LiPA yöntemiyle mikobakteri tanımlamasına gidilmiş ve INNO-LiPA Mycobacteria testinin en sık karşılaşılan mikobakteri türlerinin saptanması için başarılı bir yöntem olduğu bildirilmiştir¹⁶. Ancak bu tanısal algoritmanın maliyet-etkin olmaması nedeniyle, öncelikle manuel veya otomatize sistemler ile atipik mikobakteri ayırımının yapılması ve ondan sonra moleküler tanımlamaya gidilmesi tercih edilmektedir^{1,4,8-10,13}. Moleküler çalışmalarda da LiPA gibi yöntemlerin öncelikli olarak kullanılması ve 16S rRNA dizi analizi gibi maliyeti yüksek yöntemlerin daha ileri aşamalarda uygulanması önerilmiştir¹⁶.

LiPA yönteminin bir diğer avantajı ise, karışık (mixed) enfeksiyonların ortaya çıkarılabilmesidir. Örneğin bir çalışmada, HIV pozitif iki hastanın kan örneğinde tanımlanan *M.avium* kompleks'in yanı sıra, gözden kaçırılan ikinci bir mikobakteri türü (*M.lentiflavum*) bu yöntemle yakalanabilmiştir¹⁷. LiPA yöntemi ayrıca, tüberküloz prevalansının yüksek ve düşük bölgelerde çevresel örneklerde bulunan atipik mikobakterilerin tanımlanmasında ve karşılaştırılmasında da kullanılmıştır¹⁸.

Çalışmamızda elde edilen veriler, diğer çalışmalarla uyumlu olarak LiPA testlerinin atipik mikobakteri tanımlamasında ve karışık mikobakteriyel enfeksiyonların ortaya çıkarılmasında hızlı ve etkin bir yöntem olduğunu göstermektedir. Mikobakteri kültür pozitifliği saptadığımız 4532 örneğin etken olabileceğini düşündüğümüz 44'ünde (%1) 10 farklı atipik mikobakteri türü tanımlanmıştır. Hastanemizde izole edilen atipik mikobakteri sıklığının yüksek düzeyde olmadığı, bununla birlikte atipik mikobakterilerin tanımlanmasının tedavi protokolünün belirlenmesi açısından faydalı olacağı kanaatine varılmıştır. Çalışmamızda, *M.fortuitum*-*M.peregrinum* kompleks %16.7'lik oran ile en sık rastlanan tür olmuş, bunu %13.3 oranlarıyla *M.intracellulare*, *M.avium* kompleks, *M.chelonae* kompleks ve *M.gordonae* izlemiştir (Tablo I). Bu mikobakteri türleri yapılan çeşitli çalışmalarda atipik mikobakteri enfeksiyon etkenleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastaların yinelenen kültürlerinden aynı tür atipik mikobakterinin tanımlanması ile beraber histopatolojik bulgular ve klinik veriler atipik mikobakteri enfeksiyonu tanısının konması açısından önem taşımaktadır. Bizim çalışmamızda, bir hasta örneğinde, karışık mikobakteri paterni (MTB kompleks ve *M.scrofulaceum*) saptanmıştır (Şekil 1-J). Bunun yanı sıra çalışmaya alınmayan ve laboratuvar ve/veya çevre kontaminasyonu olarak değerlendirdiğimiz bazı örneklerde de karışık mikobakteri paternlerinin varlığı gözlenmiştir. Dolayısıyla çevrede bulunan ve fırsatçı enfeksiyon yapabilme özelliği bulunan mikobakterilerin tanımlanmasının, tüberküloz ve tüberküloz dışı atipik mikobakteri enfeksiyonlarının tanısının doğru yapılabilmesi ve tedavinin doğru ve hızlı bir şekilde uygulanabilmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir.

Atipik mikobakteri enfeksiyonlarının ayırıcı tanısında, NAP testi sonrasında moleküler yöntemlerin kullanılması hızlı, pratik ve güvenilir bulunmakta ve az rastlanan mikobakteri türlerinin tanımlanması için ileri moleküler yöntemler kullanılabilmektedir. Günümüzde, direk örnekten MTB kompleks ve sık rastlanan atipik mikobakterileri ayırt eden rutin moleküler testler kullanıma girmiştir.

Atipik mikobakteri enfeksiyonlarının saptanması ve tedavinin planlanmasında mikobakterilerin moleküler yöntemlerle tanımlanması, geleneksel yöntemlerin yerini almış gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alpaslan A. Non-tüberküloz mikobakteri enfeksiyonlarında laboratuvar tanı ve duyarlılık testleri s: 389-96. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. 2003, 1.Basım. Otak Form-Ofset Basım San. Tic. AŞ, Samsun.
2. Nolte FS, Metchock, B. *Mycobacterium*, pp: 400-37. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), Manual of Clinical Microbiology. 1995, 6th ed. ASM Pres, Washington DC.
3. Thorel MF, Huchzermeyer HF, Michel AL. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. Rev Sci Tech 2001; 20: 204-18.
4. Miller N, Infante S, Cleary T. Evaluation of the LiPA Mycobacteria assay for identification of mycobacterial species from Bactec 12B bottles. J Clin Microbiol 2000; 38: 1915-9.
5. Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculosis mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 177-215.
6. Yüce A. Nontüberküloz mikobakteri enfeksiyonlarının klinik önemi, s: 150-5. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. 2003, 1.Basım. Otak Form-Ofset Basım San. Tic. AŞ, Samsun.
7. Chan J, McKittrick JC, Klein RS. *Mycobacterium gordonae* in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1984; 101: 400.
8. Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin identifikasyonu, s: 300-10. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. 2003, 1.Basım. Otak Form-Ofset Basım San. Tic. AŞ, Samsun.
9. Ganeswire R, Chui CS, Balan S, Puthuchear SD. Comparison of Bactec MGIT 960 system and Bactec 460 TB system for growth and detection of mycobacteria from clinical specimens. Malays J Pathol 2004; 26: 99-103.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. Tentative Standard M24-T, 1995. CLSI/NCCLS, Villanova, Pa.
11. Erbaycu AE, Dereli MŞ, Çakan A, Özsöz A, Erbaycu O, Badak Z. Aktif akciğer tüberkülozu tanısı alan, Löwenstein kültürü pozitif olgularda mikobakterilerin nükleik asit çoğaltma ve biyokimyasal yöntemler ile identifikasyonu. Tuberk Toraks 2001; 49: 321-6.
12. Mijs W, De Vreese K, Devos A, et al. Evaluation of a commercial line probe assay for identification of *Mycobacterium* species from liquid and solid culture. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 794-802.
13. Sanguinetti M, Posteraro B, Ardito F, et al. Routine use of PCR-reverse cross-blot hybridization assay for rapid identification of *Mycobacterium* species growing in liquid media. J Clin Microbiol 1998; 36: 1530-3.
14. Roth A, Reischl U, Streubel A, et al. 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: 1094-104.
15. Yam WC, Yuen KY, Karn SY, et al. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. J Med Microbiol 2006; 55: 529-36.
16. Lebrun L, Gönüllü N, Boutros N, et al. Use of INNO-LiPA assay for rapid identification of mycobacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 46: 151-3.
17. Suffys P, Rocha Ada S, Brandao A, et al. Detection of mixed infections with *Mycobacterium lentiflavum* and *Mycobacterium avium* by molecular genotyping methods. J Med Microbiol 2006; 55: 127-31.
18. Ghaemi E, Ghazisaidi K, Koohsari H, Khodabakhshi B, Mansoorian A. Environmental mycobacteria in areas of high and low tuberculosis prevalence in the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2006; 12: 280-5.