

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ,  
ΖΩΟΝΟΣΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ  
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΚΑΙ  
ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΓΚΙΤΗ  
ΙΑΤΡΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010



**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΣΑΜΩΝΗΣ**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΗΛΙΑΣ ΚΡΑΜΠΟΒΙΤΗΣ**



Στους Δημήτρη και Γιώργο με πολύ αγάπη. Ποτέ δεν είναι αργά...



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ) και στο Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστήμιο Κρήτης με επιβλέποντα τον καθηγητή κ. Δημήτρη Σπαντίδο και συμμετέχοντες στην τριμελή επιτροπή τους καθηγητές κ. Γεώργιο Σαμώνη και κ. Ηλία Κραμποβίτη.

Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου πρωτίστως στον καθηγητή κ. Δημήτρη Σπαντίδο για την δυνατότητα και εμπιστοσύνη που μου έδειξε να πραγματοποιήσω αυτή την ενδιαφέρουσα επιστημονική μελέτη. Επίσης, στον καθηγητή κ. Γεώργιο Σαμώνη για την στήριξη, την βοήθεια και την αμέριστη συμπαράσταση καθώς και στον καθηγητή Ηλία Κραμποβίτη για την σοφή καθοδήγηση και συμπαράσταση σε όλα τα στάδια της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ τους συναδέλφους και φίλους συνεργάτες για την συμπαράσταση που μου προσέφεραν και μου προσφέρουν σε όποιο επιστημονικό έργο πραγματοποιώ.





<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>ΣΕΛΙΔΑ</b>
ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	21
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	27
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	37
1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ	41
1.2. ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ	43
1.3. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	45
1.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	47
1.5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	48
1.6. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ	51
1.7. ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟΧΟΥΣ ΠΟΥ ΕΘΕΣΕ Η Π.Ο.Υ.	53
<b>2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	55
2.1. Περίληψη	59
2.2. Βασική επεξεργασία δειγμάτων	60
2.3.Α. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ	
A-1. Μικροσκοπικός έλεγχος με οξεάντοχη χρώση Ziehl-Nielsen (Z-N).	62
A-2. Καλλιέργεια σε ειδικά θρεπτικά υλικά.	63
α) σε φιάλες του συστήματος MB/BacT AlerT 3D	
β) σε 2 σωληνάρια L-J	
A-3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης σε κλινικά δείγματα:	63

α) AMTD (Transcription-Mediated Amplification)	64
β) GenoType Mycobacteria Direct v.4.0 A(μέθοδος NASBA)	64
γ) GenoType MTBDRPlus (Hein-Lifescience) για ανίχνευση του	66
<i>M. tb. complex</i> και τους γόνους αντοχής στη Ριφαμπικίνη και Ισονιαζίδη.	
2.3. Β. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ	69
B-1. Καλλιεργητικοί χαρακτήρες (βιοτυπία)	69
B-2. Βιοχημικές ιδιότητες (φαινοτυπία),	69
B-3. Μοριακές δοκιμασίες ταυτοποίησης μυκοβακτηριδίων (Γονοτυπία)	72
α) Μέθοδος DNA probes (Accuprobe)	72
β) Μέθοδος DNA strip (Hein-Lifescience)	73
γ) Μέθοδος sequencing	73
2.3. Γ. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΟΧΩΝ ΣΤΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ	74
Γ-1. Έλεγχος ευαισθησίας του Μυκοβακτηριδίου της φυματιώσεως	
α ) Ταχύ αντιβιογράμμα σε φιάλες MB/BacT Alert 3D	74
β) Μέθοδος αναλογιών σε υλικό L-J	75
γ ) Μοριακές μέθοδοι:	75
• <i>MTBDRPlus assay</i> : αναζήτηση γόνων αντοχής στις ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη με την τεχνολογία DNA και ανάστροφου υβριδισμού σε ταινίες νιτροκυτταρίνης	
• <i>MTBDRIs assay</i> : αναζήτηση γόνων αντοχής στις φλουοροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες (αμικασίνη, καναμυκίνη, καπρεομυκίνη) και εθαμβουτόλη με την	

τεχνολογία DNA και ανάστροφου υβριδισμού σε ταινίες  
νιτροκυτταρίνης

- Γ-2. Έλεγχος ευαισθησίας στα Άτυπα Μυκοβακτηρίδια 77
- α) Με τη μέθοδο αναλογιών σε Lowenstein-Jensen
  - β) Με τη μέθοδο E-test

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 79

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΓΙΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΣΤΟ  
ΠΑΓΝΗ ΚΑΤΑ ΤΑ ΕΤΗ 2000-2007 84

#### 3. A. *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX* 84

A-1. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑ ΚΛΙΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ  
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΚΑΘΕ  
ΤΜΗΜΑ 87

A-2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΤΟΥ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ 90

A-3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ  
ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ 92

A-4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΚΑΙ ΥΓΡΑ  
ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ 99

A-5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* 99

A-6. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΜΕΣΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ  
ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΛΟΙΜΩΣΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ 100

## A-7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

<i>M. tuberculosis</i>	με τη μέθοδο των αναλογιών (πρωτόκολλα 10 και 11)	104
	• Μοριακή τεχνική ελέγχου αντοχής στα πρωτεύοντα αντιφυματικά φάρμακα INH και RMP (GenoType MTBDRPlus, πρωτ.6)	107
	• Μοριακή τεχνική ελέγχου αντοχής στα δευτερεύοντα αντιφυματικά φάρμακα όπως φλουοροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες και EMB (GenoType MTBDRsl, πρτ.6)	108

### 3.B. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΚΑΛΜΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΠΟ ΑΤΥΠΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ 2000-2007 ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ

110

B-1. Κατανομή των δειγμάτων, στα οποία απομονώθηκαν άτυπα μυκοβακτηρίδια.

B-2. Διερεύνηση της ποικιλότητας των ειδών μυκοβακτηριδίων που απομονώθηκαν στο ΠΑΓΝΗ.

B-3 Δοκιμασίες ευαισθησίας στα αντιμυκοβακτηριακά φάρμακα.

### 3.Γ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

114

### 3.Δ. ΣΠΑΝΙΑ και ΚΑΙΝΟΥΡΓΙΑ ΕΙΔΗ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ στο ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ του ΠΑΓΝΗ

Ταχέως αναπτυσσόμενα:

Δ-1. <i>M. thermoresistible</i> :	114
Δ-2. <i>M. europaeum</i> (GN-10643)	117
Δ-3. <i>M. GN-11124 (M. cretae)</i> :	118

Βραδέως αναπτυσσόμενα: 120

Δ-4. <i>M. herakleense</i> (GN <sub>01</sub> ):	120
---	-----

Δ-5. <i>M. GN-9680</i>	128
Δ-6. <i>M. arupense</i>	131
• <i>M. GN- 9722</i>	131
• <i>M. GN-10546</i>	134
<b>3.Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΤΥΠΩΝ</b>	
<i>ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ</i>	135
<b>4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	143
<b>5.ΣΧΟΛΙΑ</b>	161
<i>ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ</i>	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 1	163
Διαδικασία της μεθόδου NALCO-NOAH	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 2	166
Μικροσκοπική εξέταση. Οξεάντοχη χρώση βακτηριδίων	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 3	167
Σύστημα καλλιέργειας MB/BacT Alert 3D	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 4	170
Ανίχνευση <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex άμεσα σε δείγμα με τη μέθοδο: Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct (AMTD), (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA).	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 5	173
Ανίχνευση <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> άμεσα σε δείγμα με τη μέθοδο: GenoType Mycobacteria Direct v.4.0 A (Cycler), DNA strip test, (Hein Lifescience)	

GenoType MTBDRPlus (Hein-Lifescience): Ταυτόχρονη ανίχνευση του *M. tb.complex* και γόνους αντοχής στη ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη, άμεσα σε κλινικά δείγματα

GenoType MTBDRsl (Hein-Lifescience): Ταυτόχρονη ανίχνευση του *M. tb.complex* και γόνους αντοχής στις φλουοροκινολόνες (οφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη), στις αμινογλυκισίδες (αμικασίνη, καναμυκίνη, καπρεομυκίνη) και εθαμβουτόλη.

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 7

*Βιοχημικές δοκιμασίες:*

- |  |     |
|--|-----|
| 1) Παραγωγή Νιασίνης   | 181 |
| 2) Αναγωγή Νιτρικών  | 182 |
| 3) Δοκιμή ευαισθησίας στην T <sub>2</sub> CH (Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide) | 182 |
| 4) Δοκιμασίες παραγωγής καταλάσεων   | 183 |
| 5) Χρόνος ανάπτυξης αποικιών και παραγωγή χρωστικής                                  | 185 |
| 6) Παραγωγή Αρυλ-σουλφατάσης   | 186 |
| 7) Ανάπτυξη σε άγαρ Mac Conkey χωρίς Crystal violet                                  | 187 |
| 8) Δοκιμή παραγωγής ουρεάσης   | 188 |
| 9) Παραγωγή β-Γαλακτοζιδάσης (ONPG)  | 188 |
| 10) Υδρόλυση Tween 80  | 189 |
| 11) Δοκιμή ανοχής στο χλωριούχο νάτριο   | 190 |

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 8

Ταυτοποίηση Μυκοβακτηριδίων με ACCUPROBE-Mycobacteria Culture Identification test (GEN-PROBE, bioMerieux)

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 9	192
Ταυτοποίηση Μυκοβακτηριδίων με GenoType Mycobacterium CM (Common Species) και GenoType Mycobacterium AS (Additional species)	
Ταυτοποίηση <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> με GenoType MTBC (Hein Lifescience)	196
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 10	198
Ταχύ αντιβιογράμμα με το σύστημα BACT/ALERT 3D	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 11	200
Αντιβιογράμμα με τη μέθοδο αναλογιών Canetti (μέθοδος αναφοράς)	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 12	201
Μέθοδος E-test (ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας MIC) για τα Βραδέως αναπτυσσόμενα Μυκοβακτηρίδια.	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 13	202
Μέθοδος E-test για έλεγχο ευαισθησίας στα Ταχέως Αναπτυσσόμενα Μυκοβακτηρίδια.	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 14	204
Μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου ακολουθούμενη από ταυτοποίηση με το λογισμικό BLAST.	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 15	205
Μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (16S r RNA και *hsp65*) ΣΤΑ ΝΕΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΣΕ ΔΗΜΟΣΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ. 206

- 1) Αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου *hsp65* του και του γονιδίου 16S r RNA στο νέο στέλεχος, *Mycobacterium herakleense* (GN01). 180-181 206-208
- 2) Πιστοποιητικό κατάθεσης του *Mycobacterium herakleense* (GN01) σε διεθνή δημόσια συλλογή στελεχών μικροβίων. 209-210
- 3) Αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου *hsp65* και του γονιδίου 16S r RNA στο νέο στέλεχος, *Mycobacterium sp.* GN-9680 211-213
- 4) Πιστοποιητικό κατάθεσης του *Mycobacterium sp.* GN-9680 σε διεθνή δημόσια συλλογή στελεχών μικροβίων. 214-215
- 5) Αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου *hsp65* και του γονιδίου 16S r RNA στο νέο στέλεχος, *Mycobacterium sp.* 11124 (*cretae*) 216
- 6) Πιστοποιητικό κατάθεσης του *Mycobacterium sp.* GN-11124 (*cretae*) σε διεθνή δημόσια συλλογή στελεχών μικροβίων. 219
- 7) Αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου *hsp65* και του γονιδίου 16S r RNA στο νέο στέλεχος, *Mycobacterium sp.* GN-9188 220-222
- 8) Αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου *hsp65* του *Mycobacterium sp.* GN-10803 223
- 9) Πιστοποιητικό κατάθεσης του *Mycobacterium sp.* GN-10803 σε διεθνή δημόσια συλλογή στελεχών μικροβίων. 225



- 10) Αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου 16S r RNA και του γονιδίου *hsp65* στο στέλεχος, *Mycobacterium thermoresistible*. 226-228
- 11) Αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου *hsp65* και του γονιδίου 16S r RNA και ITS στο στέλεχος, *Mycobacterium arupense* (GN-9722). 229 - 231
- 12) Αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου *hsp65* και του γονιδίου 16S r RNA στο νέο στέλεχος, *M. arupense*. (GN-10546) 232-234
- 13) Αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου 16S r RNA και του γονιδίου *hsp65* στο στέλεχος, *Mycobacterium europaeum*. GN-10640 235

#### ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΕΛΙΔΑ
1.	Ανάλυση των αποτελεσμάτων των καλλιεργειών για <i>M. tb.complex</i> .	85
2.	Κατανομή των δειγμάτων ανά κλινικό τμήμα. Ποσοστά θετικών δειγμάτων ανά τμήμα προέλευσης.	88
3.	Ανάλυση δειγμάτων για TB ανάλογα με το είδος του καλλιεργητικού υλικού.	90
4.	Η σχέση της άμεσης χρώσης Z-N με τα TB δείγματα.	92
5.	Νέες βακτηριολογικά διαγνωσμένες περιπτώσεις TB ασθενών, περιόδων (2000-2003) και (2004-2007)	92
6.	Βακτηριολογικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις TB μεταξύ Ελλήνων και μεταναστών κατά τη διάρκεια 2000-2007 και των υποπεριόδων: α' (2000-2003) και β' (2004-2007)	94
7.	Βακτηριολογικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις TB μεταξύ Ελλήνων και μεταναστών ξεχωριστά για κάθε περίοδο: α' (2000-2003) και β' (2004-2007).	94

8. Ανάλυση των ειδών θετικών δειγμάτων των ασθενών, σε σχέση με την χρώση Z-N	95
9. Ανάλυση των δύο ομάδων πληθυσμού Ελλήνων και μεταναστών σε σχέση με την οξεάντοχη χρώση Z-N.	95
10. Ηλικιακές ομάδες ασθενών με TB	96
11. Μηνιαία κατανομή βακτηριολογικά διαγνωσμένων περιπτώσεων TB (2000-2007)	98
12. Βασικά στοιχεία των μοριακών εμπορικών μεθόδων για άμεση ανίχνευση <i>M. tb.complex</i> σε κλινικά δείγματα.	101
13. Αποτελέσματα ταυτοποίησης 101 Μυκοβακτηριδίων στα εξετασμένα κλινικά δείγματα.	102
14. Συγκριτική ανάλυση των θετικών και αρνητικών οξεάντοχης χρώσης δειγμάτων, σε σχέση με την προέλευσή τους και των αποτελεσμάτων των μοριακών τεχνικών.	103
15. Φαινότυποι αντοχών των 33 ανθεκτικών στελεχών <i>M. tuberculosis</i> , που απομονώθηκαν από τους 179 ασθενείς κατά της διάρκειας 2000-2007.	105
16. Συγκριτικά αποτελέσματα αντοχών των M.TB στελεχών κατά τη μελέτη των δύο περιόδων και συνολικά.	106
17. Ανθεκτικότητα στα κύρια πρωτεύοντα αντιφυματικά INH και RMP, καθώς και πολυανθεκτικότητα στελεχών <i>M. tuberculosis</i> χωριστά στους Έλληνες και στους μετανάστες.	107
18. Κριτικές συγκεντρώσεις της EMB (13 στελέχη) με τις κλασικές δοκιμασίες σε σχέση με τα αποτελέσματα της μοριακή μεθόδου MTBDRIs.	109
19. Ανάλυση των θετικών για άτυπα μυκοβακτηρίδια καλλιιεργειών.	111
20. Διαχωρισμός των περιπτώσεων με μυκοβακτηριδίωση (40) σε 10 είδη Άτυπων μυκοβακτηριδίων.	113

21. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 40 ασθενών με Μυκοβακτηριδίωση.	113
22. Σύγκριση φαινοτυπικών ιδιοτήτων του <i>Mycobacterium herakleense</i> (GN <sub>01</sub> ) με αυτά των υπόλοιπων άτυπων μυκοβακτηριδίων.	122
23. Σύγκριση φαινοτυπικών ιδιοτήτων του <i>Mycobacterium sp.</i> GN <sub>01</sub> ( <i>M. herakleense</i> ), με τα στελέχη του συμπλέγματος <i>M. terrae complex</i> .	123
24. In vitro ευαισθησίες των 14 αντιμυκοβακτηριακών ουσιών έναντι 51 Ταχέως-Αναπτυσσόμενων Μυκοβακτηριδίων, με τη μέθοδο του Etest.	136
25. In vitro ευαισθησίες 13 αντιμυκοβακτηριακών ουσιών έναντι 89 Βραδέως-αναπτυσσόμενων μυκοβακτηριδίων, με τη μέθοδο του Etest.	140
26. Σύγκριση επιδημιολογικών δεδομένων μεταξύ TB και λοιμώξεις από Άτυπα μυκοβακτηρίδια.	152

#### ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΕΛΙΔΑ
1.	ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	61
2.	ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ	70
3.	ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΡΑΔΕΩΣ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ	71
4.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΓΙΑ <i>M. tb.complex</i>	86
5.	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑ ΚΛΙΝΙΚΗ	89
6.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑ ΕΙΔΟΥΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	91
7.	ΗΛΙΚΙΑΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ	97

<b>8.</b>	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΤΖΕΛ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ <i>M. thermoresistible</i> ΠΟΥ ΠΑΡΗΧΘΗΣΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΨΗ ΤΩΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>hsp65</i> ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ	117
<b>9.</b>	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ (HPLC) του <i>M. nonchromogenicum</i> (A) και <i>M. herakleense</i> (B)	124
<b>10.</b>	ΔΕΝΔΡΟΓΡΑΜΜΑ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ 12 ΓΝΩΣΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>M. herakleense</i> , ΒΑΣΙΣΜΕΝΟ ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA	126
<b>11.</b>	ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΔΡΟ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟ ΣΤΙΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>hsp65</i> ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>M. herakleense</i>	127
<b>12.</b>	ΔΕΝΔΡΟΓΡΑΜΜΑ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ GN-9680 ΒΑΣΙΣΜΕΝΟ ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA	130
<b>13.</b>	ΗΛΕΚΤΡΟΦΩΡΗΣΗ ΣΕ ΤΖΕΛ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ PCR-RFLP ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΤΟΥ <i>hsp65</i> ΤΟΥ <i>M. arupense</i> (GN-9722)	133
<b>14.</b>	ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΕ ΤΑΙΝΙΕΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ GenoType MTBDR <i>Plus</i>	180
<b>15.</b>	ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΕ ΤΑΙΝΙΕΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ GenoType CM και GenoType AM	195
<b>16.</b>	ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ σε ΤΑΙΝΙΕΣ με τη ΜΕΘΟΔΟ GenoType MTBC	197
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	212

## **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

*Όνοματεπώνυμο:* Ζωή Γκίτη

*Τόπος γέννησης:* Πλέβεν, Βουλγαρίας

*Έτος γέννησης:* 1955

*Απολυτήριο Γυμνασίου:* Αγγλικό Γυμνάσιο Σόφιας, Βουλγαρίας, 1974

*Πτυχίο Ιατρικής:* Ιατρική Ακαδημία Σόφιας, 1980

*Υπηρεσία υπαίθρου:* Νοσοκομείο Λούκοβιτ, Βουλγαρίας, 1980-1981,

Αγροτικό Ιατρείου Κουρνά, Χανίων Κρήτης 1982-1983

*Ειδικότητα Μικροβιολογίας:* Γενικό Νοσοκομείο Βενιζέλειο, ΠΑΓΝΗ

*Τίτλος ειδικότητας:* Σεπτέμβριος 1990

*Οργανικές Θέσεις:*

Από 21/1/1992 έως 26/2/2001: Επιμελήτρια Β

Από 27/2/2001 έως 2007: Επιμελήτρια Α

Από 2007 έως 3/2010: Αναπληρώτρια Διευθύντρια

Από 3/2010 έως σήμερα: Διευθύντρια ΕΣΥ στο Εργαστήριο Κλινικής

Μικροβιολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής ΠΑΓΝΗ

***Συμμετοχή σε εκπαιδευτικά προγράμματα:***

Ενός έτους μετεκπαίδευση στο πρόγραμμα: «Υψηλή Εργαστηριακή Τεχνολογία» στο

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική σχολή.

Δύο εβδομάδες εκπαίδευση στις σύγχρονες μοριακές τεχνικές ανίχνευσης και

ταυτοποίησης μυκοβακτηριδίων στο Παρίσι (Ινστιτούτο Pasteur, νοσοκομείο Pitie-

Salpetriere).

**Εργασίες σε διεθνή περιοδικά:**

- 1). Bacterial Effect of ArF Excimer Laser Radiation, Gram negative Bacteria. Karoutis A.D., **Gitti Z.**, Charvalos E., Tselentis I., Helidonis E. *Lasers in the Life Sciences*, 1996, 7.
- 2). Shigellosis on an Italian cruise-ship. Gikas A., Pediaditis I., **Gitti Z.**, Papadakis I., Tselentis I. *Lancet* (1996) 7, vol.348.
- 3). Combined use of the fully automated Bactec MGIT 960 System and a PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for routine detection and identification of mycobacteria from clinical samples. Kontos F., Petinaki E., **Gitti Z.**, Costopoulos Ch., Anagnostou S., Tselentis I., Maniatis A. *Jour. of Microb. Methods* (2003), 52:137-140
- 4). Multicenter evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system and three molecular methods for the isolation and identification of mycobacteria from clinical specimens. Kontos F., Petinaki E., **Gitti Z.**, Nikolau S., Anagnostou S., Maniati M., Costopoulos CH., Tselentis I., Maniatis A. *Diagn Microbiol Infect Dis.* (2003) 46,
- 5). Multicenter evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide: comparison with the radiometric Bactec 460 TB system. Kontos F., Nicolau S., Kostopoulos C., **Gitti Z.**, Petinaki E., Maniati M., Anagnostou S., Raftopoulou A., Papageorgiou P., Serioubellou A., Tselentis I., Maniatis A. *J Microbiol Methods*, (2003), 55:331-33
- 6). Evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system for the susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs: a multicenter study. Kontos F., Maniati M., Kostopoulos C., **Gitti Z.**, Nicolaou S., Petinaki E., Anagnostou S., Tselentis I., Maniatis A. *J Microbiol Methods*, (2004), 56:291-294

- 7). Review of *Pasteurella multocida* infections over a 12-year period in a tertiary care hospital. Chritidou A., Maraki S., **Gitti Z.**, Tselentis I. *American J of Infect Dis*,1 (2005), 2:107-110
- 8). Use of the Genotype Mycobacterium CM and AS Assays to analyze 76 nontuberculous isolates from Greece. **Gitti Z.**, Neonakis I., Fanti G., Maraki S., Tselentis I. *J Clin Microbiol*, (2006), 44:2244-6
- 9). Genital tuberculosis in a tamoxifen-treated postmenopausal woman with breast cancer and bloody vaginal discharge. Neonakis I., Mantadakis E., **Gitti Z.**, Mitroushka I., Manidakis L., Samonis G. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* (2006), 1; 5:20
- 10). Evaluation of the Genotype MTBC assay for the differentiating 120 clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Neonakis I., **Gitti Z.**, Petinaki E., Maraki S., Spandidos D. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2007) 26:151-152
- 11). Resistance status of *Mycobacterium tuberculosis* on the island of Crete, Greece. Neonakis I., **Gitti Z.**, Baritaki M., Kourbeti I., Petinaki E., Maraki S., Krambovitis E., Spandidos D. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2007) 8:607-9
- 12). *Mycobacterium* species diversity at a general hospital on the island of Crete: first detection of *Mycobacterium lentiflavum* in Greece. Neonakis I., **Gitti Z.**, Kourbeti I., Michelaki H., Baritaki M., Alevraki G., Papadomanolaki E., Tsafaraki E., Tsouri A., Baritaki S., Krambovitis E., Spandidos D. *Scan J Infect Dis.* (2007) 39:875-9
- 13). Miliary tuberculosis with no pulmonary involvement in myelodysplastic syndromes: a curable, yet rarely diagnosed disease: case report and review of the literature. Neonakis I., Alexandrakis M., **Gitti Z.**, Tsirakis G., Krambovitis E., Spandidos D. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* (2008) 13;7:8.

- 14). Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. Neonakis I., **Gitti Z.**, Krambovitis E., Spandidos D. *J Microbiol Methods* (2008) 75:1-11
- 15). Isolation of Mycobacterium malmsonse in the island of Crete, Greece. Kourbeti I., Neonakis I., **Gitti Z.**, Spandidos D. *Indian J Med Microbiol* (2008) 3267-9
- 16). Report of 2 indigenous cases of leprosy from a European country: use of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of hsp65 gene for identification of Mycobacterium leprae directly from a clinical sample. Neonakis I., **Gitti Z.**, Kontos F., Baritaki S., Zerva L., Krambovitis E., Spandidos D. *Diagn Microbiol Infect Dis* (2009) 64:331-3
- 17). Mycobacterium thermoresistibile, a rarely isolated mycobacterium: a case-report from Europe and review of the literature. Neonakis I., **Gitti Z.**, Kontos F., Baritaki S., Petinaki E., Baritaki M., Zerva L., Spandidos D. *Indian J Med Microbiol* (2009) 3:264-7
- 18). Mycobacterium arupense pulmonary infection: antibiotic resistance and restriction fragment length polymorphism analysis. Neonakis I., **Gitti Z.**, Kontos F., Baritaki S., Petinaki E., Baritaki M., Liakou V., Zerva L., Spandidos D. *Indian J Med Microbiol* (2010) 2:173-6
- 19). Mycobacterium europaeum sp. nov., a scotochromogenic species related to Mycobacterium simiae complex. Tortoli E, Bottger E, Fabio A, Falsen E, **Gitti Z**, Grottola A, Klenk H, Mannino R, Mariottini A, Messino M, Rumpianesi F. *Int J Syst Evol Microbiol.* (2010) 6.
- 20). GenoType®MTBDRplus compared with conventional drug-susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in a low-resistance locale. **Z. Gitti**, E. Mantadakis, S. Maraki & G. Samonis, *Future Microbiol.* (2011) 6: 357-62



***Εργασίες σε ελληνικά περιοδικά:***

1). Συγκριτική μελέτη της μεθόδου ανίχνευσης χλαμυδίων του τραχώματος με χημειοφωταυγή ιχνηθέτη (Gen-Probe PACE), με την άμεση ανίχνευση με ανοσοφθορισμό σε τραχηλικά δείγματα. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής, τόμος 14, τεύχος 4, Ιούλιος-Αύγουστος 1997.

2). Αντιμικροβιακή δράση νεότερων κινολονών στο σταφυλόκοκκο-μηχανισμός αντοχής. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρίας, τόμος 42, τεύχος 5, Σεπτέμβριος-Οκτώβριος, 1997.

***Ανακοινώσεις σε διεθνή και ελληνικά συνέδρια.***

Ανακοινώσεις σε 29 διεθνή συνέδρια.

Ανακοινώσεις σε 20 ελληνικά συνέδρια.



## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**



*Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτελεί η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση της φυματίωσης με βάση νέες μεθοδολογίες άμεσης ανίχνευσης του μυκοβακτηριδίου σε κλινικά δείγματα που αφορούν την ταυτοποίηση στελεχών και την ανίχνευση της αντοχής σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Η παρούσα μελέτη ανέλυσε όλα τα δείγματα που εστάλησαν στο Εργαστήριο Μυκοβακτηριολογίας του Πανεπιστημικού Νοσοκομείου Ηρακλείου για καλλιέργειες από τον Ιανουάριο 2000 έως το Δεκέμβριο 2007, χωρισμένες σε δύο επιμέρους τετραετείς περιόδους (α 2000-2003 και β 2004-2007,) και οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες, Έλληνες και μετανάστες για λόγους αναλυτικότερης επεξεργασίας και σύγκρισης δεδομένων. Με στόχο την γρήγορη και αξιόπιστη διάγνωση των μυκοβακτηριώσεων εφαρμόστηκαν σε συνδυασμό κλασσικές και σύγχρονες μοριακές τεχνικές, οι οποίες και αξιολογήθηκαν. Εξετάστηκαν 9542 διαδοχικά δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε οξεάντοχη χρώση, καλλιέργειες σε υλικό Lowenstein-Jensen και ενοφθαλμίστηκαν στο αυτοματοποιημένο σύστημα υγρών καλλιιεργειών BacT/Alert 3D. Επιπλέον, διενεργήθηκαν και αξιολογήθηκαν στα ύποπτα και θετικά με οξεάντοχη χρώση δείγματα οι τρεις πιο σύγχρονες εμπορικές τεχνικές για άμεση ανίχνευσης μυκοβακτηριδίων σε δείγμα GenProbe (bioMerieux), GenoType MycobacteriumDirect και GenoType MTBDRplus (Hain-Lifescience). Για την ταυτοποίηση του *M. tuberculosis* και των άτυπων μυκοβακτηριδίων εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι υβριδισμού: Accuprobe (bioMerieux) και GenoType Mycobacterium CM και AS, και GenoType MTBC (Hain-Lifescience). Για την επιβεβαίωση των σπανίων και καινούργιων στελεχών χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι*

αναφοράς: η μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου και η ανάλυση του γονιδίου *heat shock 65kD* με τη μεθοδολογία ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (*Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*). Από τα ανωτέρω δείγματα απομονώθηκαν, τυποποιήθηκαν και ελέγχθηκαν για αντοχή 320 στελέχη που περιελάμβαναν 179 *Mycobacterium tuberculosis complex* και 141 άτυπα που ανήκαν σε 19 είδη μυκοβακτηριδίων (51 ταχέως και 90 βραδέως αναπτυσσόμενα). Από τα 179 *M. tb.complex*, το ένα τυποποιήθηκε ως *M. bovis*. Ο έλεγχος ευαισθησίας για τα στελέχη *M. tuberculosis* προσδιορίσθηκε με τη κλασική μέθοδο αναλογιών σε υλικό *Lowenstein-Jensen* και στο αυτοματοποιημένο σύστημα *BacT/AlerT 3D*. Εφαρμόσθηκαν και οι καινούργιες εξετάσεις ανίχνευσης γόνου αντοχής έναντι των αντιφυματικών φαρμάκων ριφαμπικίνη (*RMP*) και ισονιαζίδη (*INH*) (*Genotype MTBDRplus*) και της εθαμβουτόλης (*EMB*), τις φλουοροκινολόνες και αμνογλυκοσίδες (*Genotype MTBDRsl*). Οι δημογραφικές αναλύσεις έδειξαν ότι οι ασθενείς με φυματίωση που εξετάσθηκαν ήταν το 73,7% από την Κρήτη και οι υπόλοιποι από 11 χώρες. Εκατό σαράντα έξι στελέχη (81,%) ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντί-φυματικά φάρμακα ενώ 33 (18,4%) ήταν ανθεκτικά σε  $\geq 1$  φάρμακο. Μόνο σε μία περίπτωση βρέθηκε πολυανθεκτικό στέλεχος (0,56%). Η αντοχή στην Ισονιαζίδη και σε  $\geq 2$  αντιφυματικά φάρμακα αυξήθηκε σημαντικά από 2,9% στο 16% ( $p=0,002$ ) και από 2,9% στο 12% ( $p=0,03$ ) κατά τις δύο περιόδους. Βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ Ελλήνων και μεταναστών όσον αφορά τις αντοχές έναντι *INH*, στρεπτομυκίνης και πάρα-αμινο-σαλικυλικού οξύ. Η αντιστοιχία των αποτελεσμάτων της μοριακής τεχνικής ανίχνευσης γόνων αντοχής *MTBDRplus* και την κλασική μέθοδο αναλογιών ήταν 93,3% και 100% για την *INH* και για τα πολυανθεκτικά στελέχη (*MDR*), αντίστοιχα. Παρότι η πολυανθεκτική φυματίωση βρέθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα στην

Κρήτη, η αυξανόμενη συχνότητα της γενικής αντοχής υπογραμμίζει την ανάγκη για βελτίωση της επιτήρησης της νόσου. Για τα άτυπα μυκοβακτηρίδια η αντοχή ελέγχθηκε με τη μέθοδο του E-test. Η ανάλυση των 51 ταχέως αναπτυσσόμενων μυκοβακτηριδίων έδειξε: 26 *M. fortuitum*, 9 *M. peregrinum*, 7 *M. chelonae*, 5 *M. abscessus*, 1 *M. thermoresistible*, 2 *M. mucogenicum* και 1 *M. europaeum*. Το στέλεχος *M.thermoresistible* είναι το πρώτο που έχει απομονωθεί στην Ευρώπη και το έβδομο παγκοσμίως. Το στέλεχος M.GN-10643, μαζί με άλλα δύο στελέχη, συνιστά καινούργιο είδος άτυπου μυκοβακτηριδίου το οποίο ονομάστηκε *M.europaeum*. Τα 90 βραδέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια περιελάμβαναν: 24 *M. avium*, 4 *M. intracellulare*, 1 *M. scrofullaceum*, 4 *M. kansasii*, 1 *M. marinum*, 1 *M. malmons*, 1 *M. xenopi*, 10 *M. lentiflavum*, 29 *M. gordonae*, 2 *M. arupense*, 12 *M. GN<sub>01</sub>* και *M. GN-9680*. Κατά τη διάρκεια της μελέτης ανακαλύφθηκαν στο εργαστήριο καινούργια στελέχη άτυπων μυκοβακτηριδίων και για το λόγο αυτό προτάθηκε η ονομασία τους σε: 1) *Mycobacterium herakleense* (M.GN<sub>01</sub>), 2) *Mycobacterium hellenicum*, M.GN-9680, 3) *Mycobacterium create* (M.GN-11124). Επίσης, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα δύο πολύ σπάνια άτυπα μυκοβακτηρίδια *M. arupense* (M.GN-9722 και M.GN-10546). Τα καινούργια στελέχη, όπως και τα πολύ σπάνια κατοχυρώθηκαν στη GenBank. Τα τρία καινούργια στελέχη κατατέθηκαν και σε δύο διαφορετικά, διεθνή κέντρα φύλαξης βακτηριδίων προς ερευνητική χρήση. Σε όλα τα άτυπα μυκοβακτηρίδια πραγματοποιήθηκε έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμυκοβακτηριακά φάρμακα με τη μέθοδο του E-test





## SUMMARY

*The present report evaluated all the samples referred to the Mycobacteriology laboratory of the University Hospital of Heraklion from January 2000 to December 2007. The purpose of the study was to determine methods for rapid and reliable diagnosis of mycobacterioses, especially tuberculosis, to evaluate the combined use of conventional and molecular techniques and to analyze demographic features of these infections. A total of 9542 consecutive specimens were stained with Ziehl-Neelsen stain, cultured on Lowenstein-Jensen (L-J) slants as well as in the BacT/Alert 3D system. Furthermore, three of the most recent commercial molecular assays (GenProbe, bio-Merieux, GenoType Mycobacterium Direct and Genotype MTBDRPlus, Hein-lifescience) were conducted and analyzed for direct detection of MTBC in respiratory and non-respiratory specimens. Their performance and usefulness, not only on smear-positive samples, but also on selected smear-negative specimens, for whom the degree of suspicion of TB was high, was emphasized. Mycobacterium tuberculosis and non-tuberculous mycobacteria (NTM) were identified by Accuprobe (bio-Merieux) and GenoType Mycobacterium CM, AS and MTBC (Hein-lifescience). For identification and confirmation of new and rare strains, the two “gold” standard methods: sequencing of 16SrRNA and analysis of the heat-shock 65 kd gene by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) were used. Resistance to first-line antituberculous drugs was*

determined by the conventional proportional method on L-J medium and by the automated BacT/Alert 3Dsystem. Two new molecular assays, GenoType MTBDRPlus and GenoType MTBDRsl (Hein-lifescience), for rapid detection of genes involved in resistance in MTBC isolates were evaluated. Particularly, the GenoType MTBDRPlus detects mutations conferring resistance to rifampicine (*rpoB*) and isoniazid (*katG* and *inhA*), while the MTBDRsl permits the detection of resistance to fluoroquinolones, aminoglycosides and ethambutol by testing mutations in the genes *gyrA*, *rrs* and *embB* respectively, Drug sensitivity testing for non-tuberculous mycobacteria (NTM) was performed by the E-test method. A total of 320 mycobacterial strains were isolated including 179 MTBC and 141 NTM strains belonging to 19 mycobacterial species (51 rapid and 90 slow-growing). From the 179 MTBC only one was identified as *M. bovis* and 178 as *M. tuberculosis*. The analysis of the 51 rapid-growing mycobacteria revealed: 26 *M. fortuitum*, 9 *M. peregrinum*, 7 *M. chelonae*, 5 *M. abscessus*, 1 *M. thermoresistible*, 2 *M. mucogenicum* and 1 *M. europaeum*. The first isolation of *M. thermoresistible* in Europe and seventh globally, is reported. The mycobacterium strain GN-10643, together with two similar strains isolated in Europe, establish a new strain named *M. europaeum*. The 90 slow-growing mycobacteria consisted of 24 *M. avium*, 4 *M. intracellulare*, 1 *M. scrofulaceum*, 4 *M. kansasii*, 1 *M. marinum*, 1 *M. malmonse*, 1 *M. xenopi*, 10 *M. lentiflavum*, 29 *M. gordonae*, 2 *M. arupense*, 12 *M. GN<sub>01</sub>* (*M. herakleense*), 1 *M. GN-9680* (*M. hellenicum*). A new strain is reported and named *M. herakleense* sp. nov. because of the place of its first isolation and discovery. A second new one strain *M. GN-9680* was isolated and studied. Furthermore, a third new, rapid-growing mycobacterium strain, discovered during the study period was named *M. create* (*M. GN-*

11124). Also, two rare, non-tuberculous mycobacteria *M. arupense* were isolated and identified (*M. GN-9722* and *M. GN-10546*). The sequences of the new strains and of the rare ones were deposited in the GenBank. The three new species were also deposited to International Public Collections for preservation and investigation. Drug susceptibility testing of all non-tuberculous mycobacteria was performed using E-test method (AB Biodisk, Solna, Sweden), according to the manufacturer's instructions. A total of 132 (73,7%) positive samples were obtained from native Greeks and 47 (26,3%) from immigrants originated from 11 countries (Bulgaria 15, Romania 10, Albania 9, Georgia 4, Ukraine 2, India 2, and Finland, Kenya, Uganda and Nigeria one isolate each. One additional patient was of Kurdish origin). Drug susceptibility testing (DST) showed that 146 (81,6%) isolates were susceptible to all anti-tuberculosis agents, while 33 (18,4%) were resistant to one or more drugs, and only one (0,56%) was found MDR. Resistant to isoniazid (INH) increased significantly over the two study periods from 2,9% over the years 2000-2003 to 16% over the period 2004-2007 ( $p=0,002$ ). No significant increase in the rate of resistance to rifampicin (RMP), ethambutol (EMB), streptomycin (SM), piraziamid (PYR) or para-amino-salicylic acid (PAS) was seen. Resistance to  $\geq 2$  anti-tuberculous drugs rose over the two study periods from 2,9% to 12%, a significant increase ( $p=0,03$ ). The overall INH-resistance rate of *M. tuberculosis* strains isolated from Greeks was 5,3% (7/132), while among immigrants was 17% (8/47,  $p=0,02$ ). No significant difference in RMP and EMB was seen between Greeks and immigrants. On the other hand, SM resistance was significantly higher in immigrants (9/47 versus 8/132,  $p=0,017$ ), and this was the case with PAS (0/132 in Greeks versus 3/47 in immigrants,  $p=0,017$ ). The concordance rates of DST and GenoType MTBDRPlus assay for INH and

*RMP resistance were 93,3% (14/15) and 100% (1/1), respectively. Strengthened surveillance is necessary to control TB in our region, nevertheless the low level of MDR TB, because of the increasing rate of the general resistance.*

# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**



## **ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ**

### **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

#### **1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ**

#### **1.2 ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ**

#### **1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

#### **1.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ**

#### **1.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ**

#### **1.6 ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ**

#### **1.7 ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ**

**ΤΗΣ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟΧΟΥΣ ΠΟΥ ΕΘΕΣΕ Η ΠΟΥ**

Τα μυκοβακτηρίδια είναι μια ομάδα από ανθεκτικά μικρόβια, που προκαλούν λοιμώξεις με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα. Η συχνότητα των λοιμώξεων αυτών συνεχώς αυξάνεται λόγω της αυξημένης ανησυχίας ως παθογόνο για τον άνθρωπο και λόγω βελτιωμένων μεθόδων ανίχνευσης και καλλιέργειας. Τα τελευταία είκοσι χρόνια έγινε μεγάλη πρόοδος στο τομέα της εργαστηριακής διάγνωσης των μυκοβακτηριακών λοιμώξεων. Η εισαγωγή νέων τεχνολογιών, αυτοματοποιημένων συστημάτων και τεχνικών έχουν φέρει επανάσταση στη διάγνυσή τους. Τώρα τα εργαστήρια είναι καλύτερα προετοιμασμένα από πριν και εξασφαλίζουν γρηγορότερη και ακριβέστερη πληροφορία που βελτιώνει το χειρισμό του ασθενούς. Οι εκδηλώσεις των μυκοβακτηριακών λοιμώξεων διαφέρουν ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, το είδος του μυκοβακτηριδίου, την ανοσολογική κατάσταση και διάφορους άλλους παράγοντες κινδύνου. Σήμερα έχουν περιγράψει περισσότερα από 130 είδη Μυκοβακτηριδίων από τα οποία τουλάχιστον 21 είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και συχνά απομονώνονται από κλινικά δείγματα. Πρόκληση είναι η εισαγωγή νέων ειδών στον είδη μακρύ κατάλογο ευκαιριακών μυκοβακτηριδίων. Τα μυκοβακτηρίδια κατατάσσονται σε δύο ομάδες τα *M. tuberculosis complex* και τα «μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια», τα οποία αποκτούν ιδιαίτερη σημασία. Τα «μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια» είναι παντού. Υπάρχουν στο νερό, στο βιοφίλμ, στο έδαφος, στα αερολύματα. Ανθρώπινες δραστηριότητες όπως απολυμάνσεις οδηγούν σε επιλογή μυκοβακτηριδίων. Προκαλούν πνευμονικές και μη-πνευμονικές λοιμώξεις στις οποίες ιδιαίτερα ευαίσθητοι είναι οι ασθενείς με ανοσοκαταστολή, χρόνια πνευμονοπάθεια, κυστική ίνωση, και στους ηλικιωμένους. Το



σημαντικότερο μυκοβακτηρίδιο παραμένει το *M. tuberculosis*, ως αίτιο της φυματίωσης. Κατά μέσο όρο ένας άνθρωπος με ενεργή φυματίωση μολύνει 10 έως 15 άλλους κάθε χρόνο (4,13,53,84,120,187,193).

## 1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ

Ασθένεια της αρχαιότητας, η φυματίωση χρονολογείται από 5000 π. χ. Με πρώτα στοιχεία από νεολιθικό τάφο και από αιγυπτιακά έργα ζωγραφικής ταφών 4000 π.χ. Ο Ιπποκράτης το 460-337 π.Χ. πειραματίστηκε με την φυματίωση και την ονόμασε «φθίσιν».

Το 1679 ο Sylvius, στο Opera medica, πρώτος αναγνώρισε πραγματικά την ενεργό φυματίωση από χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στους πνεύμονες και σε άλλες περιοχές του οργανισμού. Ο Marget, το 1702, περιέγραψε τα παθολογικά χαρακτηριστικά της φυματίωσης. Το ίδιο έτος ο άγγλος φυσικός Marten, πρώτος γνωστοποίησε τη θεωρία ότι «η φυματίωση προκαλείται από υπέροχα λεπτά ζωντανά δημιουργήματα τα οποία δημιουργούν σπήλαια στους πνεύμονες». Ο Herman Brehmer, ένας βοτανολόγος που έπασχε από φυματίωση, μετά τη διαμονή του στα Ιμαλάια επέστρεψε απαλλαγμένος από την ασθένεια και το 1854 ήταν ο πρώτος που έκτισε ινστιτούτο μέσα σε δάσος, όπου οι ασθενείς μπορούσαν να αναπνέουν καθαρό αέρα. Το 1865 ο γάλλος γιατρός Antine Vilemin απέδειξε ότι η φυματίωση μπορεί να μεταδοθεί από τους ανθρώπους στα ζώα και από τα ζώα στο περιβάλλον.

Έγινε αιτία της «Άσπρης Πανούκλας» τον 17ο και 18ο αιώνα στην Ευρώπη. Είχαν κοινή μοίρα ο Χάινριχ Χάινε, ο Σοπέν, ο Άντον Τσέχοφ, ο Φράντζ Κάφκα, ο Τζορτζ Ορουελ, η Ελεανόρ Ρούσβελτ. Πέθαναν από φυματίωση. Σχεδόν 100% του Ευρωπαϊκού

πληθυσμού μολύνθηκε με *M. tuberculosis* και το 25% όλων των ενήλικων θανάτων οφείλονταν στη φυματίωση.

Στο τέλος του 19ου αιώνα η φυματίωση έγινε παγκόσμια επιδημία με 7 εκατομ. θανάτους ανά έτος. Σε χειρότερη μοίρα ήταν οι δύο πόλεις Λονδίνο και Νέα Υόρκη λόγω βιομηχανικής επανάστασης (συγκέντρωση πολλών ανθρώπων μαζί στη δουλειά και στο σπίτι). Ο συνωστισμός αυτός δημιούργησε άριστες συνθήκες για την ασθένεια, τόσο ενδημική στη φτώχεια

Ήταν το 1882 όταν ο Robert Koch ανακάλυψε την αιτία της φυματίωσης, το *M. tuberculosis*. Η ανακάλυψη τις ακτίνες X από το γερμανό Wilhelm-Conrad Roentgen το 1896, επέτρεψε τον γάλλο ιατρό Antoine Beclere να εφαρμόσει για πρώτη φορά την ακτινογραφία ως βέβαια διάγνωση της φυματίωσης.

Εξαιτίας της έρευνας αυτής στις αρχές της δεκαετίας 1920, ο Calmette και Queren έκαναν το πρώτο εμβόλιο κατά της φυματίωσης.

Ο Γάλλος Charls Mantoux, (1877-1947), εισήγαγε τη φυματινοαντίδραση Mantoux το 1908 η οποία χρησιμοποιείται έως σήμερα ως διαγνωστικό μέσο.

Καθοριστική για την πρόληψη της φυματίωσης ήταν η παρασκευή του εμβολίου B.C.G. (Bacille de Calmette-Gueren) από τους Calmette Albert (1863-1932), Guerin Camile (1872-1961), και ο Benjamine Weill-Hale (1875-1958) το 1906 και η χρησιμοποίησή του το 1921 για τον εμβολιασμό των παιδιών.

Το 1943 ο Scilman A Waksman δημιούργησε ένα αποτελεσματικό αντιβιοτικό για τη θεραπεία της φυματίωσης: τη στρεπτομυκίνη, το μόνο διαθέσιμο φάρμακο έως το 1952, όταν ο Kusner ανακάλυψε την πυραζιναμίδα. Την ίδια περίοδο ένα συνθετικό φάρμακο, η ισονιαζίδη (υδραζίνη του ισονικοτινικού οξέος), αλλάζει δραστικά την πρόγνωση της

νόσου. Για πρώτη φορά το 1962 χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό φάρμακο εθαμβουτόλη και το 1969 το ημισυνθετικό παράγωγο της ρυφαμυκίνης Β, η ριφαμικίνη. Ο συνδυασμός των τεσσάρων φαρμάκων (INH, ΡΜΠ, ΕΜΒ και ΡΥΡ) αποτελεί έως και σήμερα το βασικό σχήμα για την θεραπεία της φυματίωσης. Ελάχιστα νέα αντιφυματικά φάρμακα έχουν παρουσιαστεί τα τελευταία χρόνια.

Στη δεκαετία του 1980 η αναζωπύρωση της νόσου συσχετίστηκε με την εξάπλωση της επιδημίας από HIV, την αύξηση των μεταναστών από ενδημικές χώρες, την αύξηση των ατόμων με παράγοντες κινδύνου και την χαλάρωση των αντιφυματικών προγραμμάτων (45,122,147,204).

## 1.2 ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ

Η φυματίωση εξακολουθεί ακόμα και σήμερα να αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα δημόσιας υγείας και ένα από τα πιο σημαντικά αίτια θνησιμότητας παγκοσμίως. Σύμφωνα με τα δεδομένα του ΠΟΥ(Παγκόσμιο Οργανισμού Υγείας), το 1/3 περίπου του πληθυσμού της γης έχουν μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, περίπου 10 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούν ετησίως και από αυτούς 2 εκατομμύρια πεθαίνουν, εκ των οποίων 450-500.000 είναι παιδιά. (WHO/HTM/TB/2006,205,) Η κατανομή της φυματίωσης ανά τον κόσμο δεν είναι ομοιογενής. Πάνω από το 96% των θανάτων, 95% της νόσου, και 80%της μόλυνσης αφορά τις φτωχότερες χώρες με κίνδυνο μόλυνσης 0,5-2,5%. Στις αναπτυσσόμενες χώρες το 77% των κρουσμάτων αφορούν ηλικίες κάτω των 50 ετών, ενώ στις αναπτυγμένες χώρες το 80% είναι άνω των 50 ετών. (14,102) Στην Ευρώπη, σύμφωνα με

τα στοιχεία της Euro TB 2004, καταγράφηκαν 414163 περιπτώσεις φυματίωσης με μεγάλες διακύμανσης της επίπτωσης της στις διάφορες χώρες. Τελευταίες εκτιμήσεις του Π.Ο.Υ. δείχνουν ότι από το 2000 έως το 2020 ένα δισεκατομμύριο άνθρωποι θα μολυνθούν, 200,000 θα νοσήσουν και 35 εκατομ θα πεθάνουν από φυματίωση.

Με την εμφάνιση του AIDS και την ευρεία μετακίνηση αλλοδαπών από περιοχές όπου η νόσος ενδημεί, η φυματίωση έχει καταστεί πρόβλημα και για τις αναπτυγμένες χώρες. Στην Ελλάδα τα τελευταία 15-20 χρόνια παρατηρείται αύξηση της φυματίωσης, αποτέλεσμα κυρίως της αθρόας μετανάστευσης ατόμων από χώρες με πολύ υψηλή επίπτωση της νόσου: Πρώην Σοβιετική Ένωση, χώρες της Βαλτικής, Ανατολικής Ευρώπης και Ασίας.

Πρόβλημα αποτελεί όχι μόνο η διάγνωση των πασχόντων μεταναστών, αλλά πολύ περισσότερο η παρακολούθηση τους για την σωστή εφαρμογή της αντιφυματικής θεραπείας, απαραίτητη προϋπόθεση για τη μη εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών. Παράγοντας αυξημένου κινδύνου αποτελεί η προοδευτική αύξηση των πολυανθεκτικών (Multi-Drug Resistant- MR.) και υπερανθεκτικών στελεχών (Extensively Drug Resistant- XDR), (26,50,105). Σύμφωνα με αποτελέσματα του νοσοκομείου Σωτηρία, υπάρχει αυξημένη ανθεκτικότητα στη χώρα μας συγκριτικά με τις Δυτικές Ευρωπαϊκές χώρες, τόσο στο σύνολο, όσο και ειδικά στους έλληνες ασθενείς.(87,88).

### 1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Το είδος *Mycobacterium* ανήκει στη συνομοταξία Actinobacteria τάξης Actinomycetales – οικογένεια Mycobacteriaceae – γένος *Mycobacterium*- είδος *Mycobacterium*.

Όλα τα είδη του γένους *Mycobacterium* είναι αερόβια, ακίνητα, μη σπορογόνα με ποικίλη μορφολογία και μέγεθος, ασθενώς Gram-θετικά βακτήρια. Χρόνος διπλασιασμού τους (χρόνος μιας γενιάς) είναι 18-24 ώρες, ενώ για το βακτηρίδιο *E.coli* είναι 20-30 λεπτά. Έχουν την μεγαλύτερη εκατοστιαία αναλογία βάσεων G+C: 61-71%. Σημείο αναφοράς είναι η οξεαντοχή, δηλαδή η αντοχή στον αποχρωματισμό μετά από χρώση με φαινικούχο φουξίνη και αποχρωματισμό με διάλυμα οξέος. Ο ειδικός χρωματισμός με τη χρώση Ziehl- Neelsen, οφείλεται στο μοναδικό τοίχωμα των μυκοβακτηριδίων, το οποίο έχει καθοριστική σημασία στη παθογένεια και στη διαγνωστική μεθοδολογία. Επίσης, συμμετέχει στην αντίσταση σε πολλά αντιβιοτικά, στους μηχανισμούς κυτταρικής υπερευαισθησίας, στην αντίσταση στην ωσμωτική λύση μέσω εναπόθεσης συμπληρώματος. Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος του μυκοβακτηριδίου έχει δυο βασικά συστατικά: πεπτιδογλυκάνη και γλυκολιπίδια. Η πεπτιδογλυκάνη καλύπτει την κυτταροπλασματική μεμβράνη και περιέχει N-γλυκολίλ-μουραμικό οξύ στη θέση του N-ακετύλ-μουραμικού οξέος των Gram(-) βακτηρίων για να συνδεθεί με φωσφοδιεστερικό δεσμό με το πολυμερές Αραβινογαλακτάμη. Η Αραβινογαλακτάμη, βρισκόμενη πάνω από τη Πεπτιδογλυκάνη, αποτελεί γέφυρα για τη στιβάδα των μοναδικών Μυκολικών οξέων (β-υδρόξυ λιπαρά οξέα), με τα οποία συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς. Η μοναδική δομή του τύπου Μυκολίλ-Αραβινογαλακτάμη-Πεπτιδογλυκάνη αποτελεί το μεγαλύτερο βακτηριακό μακρομόριο

που έχει ανακαλυφθεί. Η στιβάδα των Μυκολικών οξέων περιβάλλεται από ένα Πολυσακχαριδικό έξω στρώμα (Μουκοσίδες), μίγμα γλυκολιπιδίων, χαλαρά συνδεδεμένων με το τοίχωμα. Η κυριότερη βιολογικά δραστική ουσία τους είναι το δισακχαρίδιο trehalose dimycolate ή cord factor. Ένα από τα κυριότερα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος είναι η Λίποαραβινομανάνη (LAM), glucosconjugate, το οποίο εμπλέκεται σε πολλές αλληλοεπιδράσεις με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και έτσι συμβάλει στην επιβίωση του παθογόνου. Η λιπιδική της περιοχή (phosphatidyl-inositol), συνδέει το LAM είτε με την κυτταρική μεμβράνη, είτε με τα λιπίδια του εξωτερικού μέρους του κυτταρικού τοιχώματος. Με την ινοσιτόλη της λιπιδικής περιοχής συνδέεται η μαννόζη δημιουργώντας τη Λιπομανάνη (LM). Στο μόριο Λιπομανάνη (LM) προστίθεται η δεύτερη γλυκοσιδική περιοχή: το διακλαδωμένο πολυμερές αραβινόζη, το οποίο περιέχει τη σπάνια αραβινοφουρανόζη. Οι απολήξεις των διακλαδώσεων των LAM έχουν διαφορετική σύνθεση στα διάφορα μυκοβακτηρίδια. Στα μολυσματικά μυκοβακτηρίδια οι απολήξεις αυτές καλύπτονται από μια βραχεία ομάδα μορίων μαννόζης δίκην καπέλου και το LAM τότε ονομάζεται MANLAM. Το «καπέλο» των μη μολυσματικών είναι διαφορετικό, αποτελείται από phosphor-myo-inositol, και ονομάζεται APALAM.(89,102,118,163).

Το **γονιδίωμα** των Μυκοβακτηριδίων περιέχει περίπου 4,4 εκατομ. ζεύγη βάσεων και περίπου 4000 γονίδια. Πάνω από 200 γονίδια κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Αυτός ο μεγάλος αριθμός ενζύμων που χρησιμοποιεί λιπαρά οξέα, σχετίζεται πιθανόν με την ικανότητα του παθογόνου να αναπτύσσεται στους ιστούς του ξενιστή, όπου τα λιπαρά οξέα είναι βασική πηγή άνθρακα. (167) Το γονιδίωμα επίσης είναι πλούσιο σε επαναλαμβανόμενες εμβόλιμες

αλληλουχίες (insertion sequences) και κοντά επαναλαμβανόμενα DNA μόρια (short repetitive DNA). Η ύπαρξη μεγάλου ποσοστού κωδικονίων, πλούσιων σε G+C, έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη χρήση αμινοξέα Ala, Gly, Pro, Arg και Trp.(31) Έχει μέγεθος  $3-5,5 \times 10^9$  Da και είναι σε κλειστό κύκλο. Η γενετική ακολουθία 16SrRNA χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη και ταξινόμηση των Μυκοβακτηριδίων. Η φυλογενετική άποψη στην ταξινόμησή τους βοηθά στη σωστή κατάταξή τους.(29,31,33,71,178)

#### 1.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Δεν υπάρχει ακόμα ένα παραδεκτό σχήμα ταξινόμησης όλων των ειδών Μυκοβακτηριδίων.

Ένας πρώτος διαχωρισμός είναι σε *Mycobacterium tuberculosis* complex και Non-tuberculous mycobacteria NTM, (μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια).

Άλλος διαχωρισμός είναι κατά Runyon (1959) ταξινόμηση σε 4 ομάδες:

1) Φωτοχρωμογόνα (παράγουν χρωστική στο φως π.χ. καροτίνες, ξανθοφύλλες)

*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*.

2) Σκοτοχρωμογόνα (παράγουν χρωστική απουσία φωτός) όπως *M. gordonae*,

*M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. flavescence*.

3) Μη χρωμογόνα: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. terrae*, *M. gastri*, *M. nonchromogenicum*, *M. triviale*.

4) Ταχέως αναπτυσσόμενα (ανάπτυξη σε λιγότερο από 7 ημέρες), *M. fortuitum-chelonae* complex, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*.

Η Ευρωπαϊκή Εταιρία Μυκοβακτηριολογίας (1991) προτείνει ταξινόμηση ανάλογα με τον κίνδυνο πρόκλησης νόσου σε τρεις βασικές ομάδες κινδύνου:

Ομάδα κινδύνου Α: Μυκοβακτηρίδια σπανιότατα παθογόνα (σαπρόφυτα)

*M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. parafortuitum*, *M. gastri*, *M. nonchromogenicum*, *M. gordonae*, *M. terrae*.

Ομάδα κινδύνου Β: Μυκοβακτηρίδια δυνητικά ή ευκαιριακά παθογόνα

(*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. malmonse*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. genovense*).

Ομάδα κινδύνου Γ: Μυκοβακτηρίδια υποχρεωτικά παθογόνα:

(*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. ulcerans*, *M. microti*, *M. leprae*).

Το *M.tuberculosis* complex δεν αναπτύσσεται στο περιβάλλον, ενώ τα NTM (Non Tuberculous Mycobacteria) αναπτύσσονται και βρίσκονται συνήθως στο φυσικό περιβάλλον και δεν ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα των ανθρώπων.(17)

## 1.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Το Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης δεν διαθέτει τα κλασικά στοιχεία βακτηριακής παθογένειας όπως τοξίνες, κάψουλες και ινίδια αλλά αρκετές δομικές και φυσιολογικές ιδιότητες που συνεισφέρουν στην παθογένειά του.

Η παθογένεια της φυματίωσης μπορεί να παρομοιαστεί με σειρά από μάχες μεταξύ των ξενιστή και του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης. Το *M tuberculosis* χρησιμοποιεί ειδικό μηχανισμό εισβολής στο κύτταρο. Συνδέεται άμεσα με τους υποδοχείς της μαννόζης των μακροφάγων μέσω γλυκολιπιδίων της μαννόζης και LAM, ή έμμεσα μέσω με υποδοχείς συμπληρώματος ή Fc υποδοχείς. Η ικανότητά του να αναπτύσσεται



ενδοκυττάρια έχει ως αποτέλεσμα τη διαφυγή του από το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή, π.χ. αντισώματα και συμπλήρωμα. Η φαγοκύτωση του από τα μακροφάγα εμποδίζει τη σύντηξη του φαγοσώματος με το λυσόσωμα. Η έκκριση πρωτεΐνης από το βακτηρίδιο τροποποιεί τη μεμβράνη του φαγοσώματος και το μυκοβακτηρίδιο είτε μένει στο φαγόσωμα, είτε φεύγει από αυτό, βρίσκει στο μακροφάγο προστατευτικό περιβάλλον για την ανάπτυξή του. Κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης παράγονται κυτταροτοξικές ρίζες οξυγόνου τις οποίες το *M. tuberculosis* αντιμετωπίζει με δύο βασικούς μηχανισμούς: ο ένας είναι όταν τα γλυκολιπίδια, σουλφατίδια και Λιποαραβινομανάνη (LAM) αναστέλλουν τη δράση των προϊόντων του οξυγόνου, ο άλλος είναι η είσοδος του στα μακροφάγα μέσω υποδοχείς του συμπληρώματος, όπως CR3, που δεν ενεργοποιεί τον αντιμικροβιακό οξειδωτικό μηχανισμό. Παράγοντες παθογένειας είναι ο αργός ενδοκυττάριος πολλαπλασιασμός, η μεγάλη συγκέντρωση λιπιδίων στο κυτταρικό τοίχωμα, ο σχοινοειδής παράγων (cord factor) και το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Antigen 85 complex, το οποίο συνδέεται με τη fibronectin. Η ύπαρξη φυσικών μεταλλακτών στα λοιμογόνα στελέχη επηρεάζει τη παθογένεια της νόσου. (89)

Παράγοντας κινδύνου και ανησυχίας αποτελεί η προοδευτικά αυξανόμενη εξάπλωση πολυανθεκτικών (Multi-Drug Resistant-MDR) αλλά και υπερανθεκτικών στελεχών (Extensively Drug Resistant-XDR). Όπως είναι γνωστό πολυανθεκτικά θεωρούνται τα *M. tuberculosis* στελέχη με ταυτόχρονη ανθεκτικότητα τουλάχιστον σε INH και RMP, ενώ υπερανθεκτικά, αυτά με ανθεκτικότητα σε INH και RMP, σε κινολόνη και επιπλέον, σε ένα από τα δεύτερης γραμμής ενέσιμα αντιφυματικά (Αμικασίνη, Καναμυκίνη ή Κάπρεομυκίνη).

Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια παρουσιάζουν κυμαινόμενη διαμόλυνση και νοσηρότητα. Στις αναπτυγμένες χώρες παρουσιάζουν αυξημένη νοσηρότητα με κυριότερους παράγοντες κινδύνου το HIV, τη ΧΑΠ, τις παλαιές φυματιώδες βλάβες, την ινωκυστική νόσου, στη γήρανση του πληθυσμού.(107). Τα περισσότερα άτυπα μυκοβακτηρίδια έχουν απομονωθεί από το νερό και το έδαφος. Το πιο μελετημένο από όλα είναι το *M. avium* complex, το οποίο αναπτύσσεται καλά σε φυσικά νερά. Τα MAC, έχοντας αποκτήσει πλασμίδια που πιθανόν να σχετίζονται με τοξικότητα (τοξικά πλασμίδια), κατά προτίμησης, γίνονται αιωρούμενα σταγονίδια (αεροζόλ), εξασφαλίζοντας έτσι το μηχανισμό της αερογενούς μόλυνσης. Το νερό είναι επίσης και η πηγή μόλυνσης για αρκετά άτυπα είδη όπως *M. marinum*, *M. kansasii*, ταχέως αναπτυσσόμενα *M. xenopi*, *M. simiae* ενδονοσοκομειακές επιδημίες. Το *M. kansasii* επιζεί έως 12 έως 12 μήνες σε νερό βρύσης, αλλά όχι στο έδαφος. Τα ταχέως αναπτυσσόμενα ανευρίσκονται στο έδαφος και σε φυσικές πηγές νερού και είναι τα πιο σύνηθες αίτια των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (ανθεκτικά στα απολυμαντικά και στη χλωρίνη, μολύνουν ιατρικά σκεύη). Παρά την ύπαρξη 30 ταχέων αναπτυσσόμενων ειδών , το 90% των απομονώσεων τους οφείλεται στα *M. fortuitum*, *M. chelonae*, και *M. abscessus*.

Πολλά δεν έχουμε κατανοήσει για την παθογένεια των άτυπων μυκοβακτηριώσεων και μόλυνση στον άνθρωπο. Η μετάδοση από άτομο σε άτομο είναι σπάνια. Είναι γενικά αποδεκτό, ότι η πλειοψηφία των ατόμων μολύνονται από άτυπα μυκοβακτηρίδια του περιβάλλοντος.

Συνηθισμένη πηγή μόλυνσης, η αερογενής, παίζει σημαντικό ρόλο στα αναπνευστικά νοσήματα. Ενώ στα παιδιά και στους ασθενείς με AIDS, η πεπτική οδός είναι ο τρόπος της μόλυνσης. Ακολουθεί αποικισμός του πεπτικού με άτυπο μυκοβακτηρίδιο, διασπορά

και συμμετοχή πολλαπλών συστημάτων και οργάνων (λεμφαδένες, συκώτι, σπλήνας). Απ ευθείας ενοφθαλμισμός γίνεται στο δέρμα από νερό ή άλλη πηγή σε ασθενείς με φλεγμονές μαλακών μορίων. Αυξημένη συχνότητα της νόσου με μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια, ίσως οφείλεται και στο ζεστό, τροπικό κλίμα, αλλαγές στις συνήθειες των ανθρώπων, (συχνά ντους: έκθεση σε αεροζόλ), γήρανση του πληθυσμού.(22,40,47,67,77,83,91,97,132,143)

## 1.6 ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ

Η μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος των δειγμάτων αποτελεί τον γρηγορότερο τρόπο βακτηριολογικής επιβεβαίωσης της φυματίωσης. Η ποσοτική εκτίμηση των οξεάντοχων βακτηρίων δείχνει τη μεταδοτικότητα της νόσου και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.(American Thoracic Society, Diagnostic standards and classification of Tb in adults and children.), (5) Χρειάζονται τουλάχιστον 3 δείγματα πρωινών πτυέλων του ασθενούς, τα οποία αποστέλλονται σε λιγότερο από 24 ώρες στο εργαστήριο (126). Το κατάλληλο δείγμα προέρχεται από το κατώτερο αναπνευστικό με βαθύ βήχα και συλλέγεται σε αποστειρωμένα δοχεία. (75,76). Σε ασθενείς με αδυναμία απόχρεμψης, γίνεται λήψη 3 διαδοχικών δειγμάτων προκληθέντων πτυέλων με νεφελοποίηση 30-90 ml υπέρτονου χλωρονατριούχο διαλύματος. Το γαστρικό υγρό αποτελεί το καλύτερο υλικό για τα παιδιά με πνευμονική φυματίωση. Αναρροφώνται 30-50 ml γαστρικού υγρού το πρωί. Η πιο ευαίσθητη διαγνωστική εξέταση είναι η καλλιέργεια των βρογχικών υλικών.(131). Τρία δείγματα πρωινών ούρων για B.Koch στέλνονται από ασθενή με υποψία, ακόμα και όταν τα ευρήματα από το ουροποιητικό δεν είναι συμβατά. Δείγματα από κάθε βιολογικό υλικό επεξεργάζεται στο εργαστήριο

όπως: πύο, υγρό, βιοψία, κόπρανα, αίμα, μυελός, ENY. Οι καλλιέργειες όλων των δειγμάτων για μυκοβακτηρίδιο είναι ο χρυσός κανόνας για τη διάγνωσή της νόσου, όπως και για τον έλεγχο ευαισθησίας των αντιφυματικών φαρμάκων (19,137,141). Μοριακές τεχνικές διάγνωσης φυματίωσης αποτελούν μέρος της καθημερινής πράξης του εργαστηρίου καθώς παρέχουν άμεσες πληροφορίες για τη μυκοβακτηριδιακή λοίμωξη, στην ταυτοποίηση του είδους του μυκοβακτηριδίου σε θετικές καλλιέργειες και στον έλεγχο της αντοχής στη ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη.

Οι μοριακές τεχνικές δεν είναι σε θέση να αντικαταστήσουν την καλλιέργεια. Θα πρέπει να ερμηνεύονται με συνεκτίμηση της κλινικής εικόνας. Παρουσιάζουν χαμηλότερη ευαισθησία σε νόσο με αρνητικό επίχρισμα πτυέλων συνδυασμός της κλασικής καλλιέργειας και των μοριακών τεχνικών βοηθά σημαντικά στη διάγνωση και θεραπεία των μυκοβακτηριώσεων. (128,168,175,202,208)

Στο εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου λειτουργεί τμήμα Μυκοβακτηριδίων με στόχο την ταχεία και αξιόπιστη διάγνωση των μυκοβακτηριδιώσεων. Εφαρμόστηκε συνδυασμός κλασικής και νέας μεθοδολογίας.

Στην παρούσα μελέτη ελέχθησαν τα αποτελέσματα των εξετάσεων του εργαστηρίου, ώστε να αξιολογηθούν αναδρομικά οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν.(68,86,136,142,166,172,207)

## 1.7 ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟΧΟΥΣ ΠΟΥ ΕΘΕΣΕ Η Π.Ο.Υ.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης ακολουθήθηκαν τέσσερις βασικές κατευθύνσεις, ώστε να επιτευχθούν οι στόχοι που έχει θέσει η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας για εξάλειψη της φυματίωσης στον κόσμο έως το 2050.

- Αξιολόγηση των δημογραφικών και εργαστηριακών δεδομένων των ασθενών με φυματίωση.
- Εργαστηριακή διερεύνηση όλων των περιστατικών μυκοβακτηριδίου με την χρήση των διαθέσιμων, ποιοτικά ελεγμένων διαγνωστικών μέσων για ταυτοποίηση και έλεγχο ευαισθησίας.
- Εφαρμογή και αξιολόγηση νέων διαγνωστικών μεθόδων για την έγκαιρη ανίχνευση του *M. tuberculosis* στα κλινικά δείγματα και των γονιδίων αντοχής στα αντιφυματικά φάρμακα.
- Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και συμπεράσματα.



## **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**





## **ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ**

### **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

#### **2.1. Περίληψη**

#### **2.2. Βασική επεξεργασία δειγμάτων**

#### **2.3.A. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ**

**A-1. Μικροσκοπικός έλεγχος με οξεάντοχη χρώση Ziehl-Nielsen (Z-N).**

**A-2. Καλλιέργεια σε ειδικά θρεπτικά υλικά.**

**α) σε φιάλες του συστήματος MB/BacT AlerT 3D**

**β) σε 2 σωληνάρια L-J**

**A-3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης σε κλινικά δείγματα:**

**α) AMTD (Transcription-Mediated Amplification)**

**β) GenoType Mycobacteria Direct v.4.0 A(μέθοδος NASBA)**

**γ) GenoType MTBDRPlus (Hein-Lifescience) για ανίχνευση του**

**M. tuberculosis complex και γόνους αντοχής στη Ριφαμπικίνη και Ισονιαζίδη.**

#### **2.3. B. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ**

**B-1. Καλλιεργητικοί χαρακτήρες (βιοτυπία)**

**B-2. Βιοχημικές ιδιότητες (φαινοτυπία),**

**B-3. Μοριακές δοκιμασίες ταυτοποίησης μυκοβακτηριδίων (Γονοτυπία)**

**α) Μέθοδος DNA probes (Accuprobe)**

**β) Μέθοδος DNA strip (Hein-Lifescience)**

γ) Μέθοδος sequencing

### 2.3.Γ. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΟΧΩΝ ΣΤΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ

Γ-1. Έλεγχος ευαισθησίας του Μυκοβακτηριδίου της φυματιώσεως

α) Ταχύ αντιβιογράμμα σε φιάλες MB/BacT Alert 3D

β) Μέθοδος αναλογιών σε υλικό L-J

γ) Μοριακές μέθοδοι:

- *MTBDRPlus assay*: αναζήτηση γόνων αντοχής στις ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη με την τεχνολογία DNA και ανάστροφου υβριδισμού σε ταινίες νιτροκυτταρίνης
- *MTBDRIs assay*: αναζήτηση γόνων αντοχής στις φλουοροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες (αμικασίνι, καναμυκίνη, καπρεομυκίνη) και εθαμβουτόλη με την τεχνολογία DNA και ανάστροφου υβριδισμού σε ταινίες νιτροκυτταρίνης

Γ-2. Έλεγχος ευαισθησίας στα Άτυπα Μυκοβακτηρίδια

α) Με τη μέθοδο αναλογιών σε Lowenstein-Jensen

β) Με τη μέθοδο E-test

Στη μελέτη περιλήφθησαν όλα τα δείγματα που εστάλησαν στο Εργαστήριο για καλλιέργειες μυκοβακτηριδίων από το Ιανουάριο 2000 έως το Δεκέμβριο 2007, χωρίζοντας το διάστημα αυτό σε δύο επιμέρους τετραετείς περιόδους α' (2000-2003) και β' (2004-2007) για την αναλυτικότερη επεξεργασία και σύγκριση των δεδομένων.

Τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία όπως ενδείκνυται, ακολούθησε η χρώση Ziehl-Neelsen (Z-N), ο εμβολιασμός στις φιάλες του συστήματος BacT/Alert 3D (bioMerieux) για επώαση 42 ημερών και σε σωληνάρια με υλικό Loewenstein-Jensen (L-J) για επώαση δύο μηνών στους 37°C.

Σε θετική για μυκοβακτηρίδια καλλιέργεια εφαρμόστηκαν οι κλασικές και μοριακές δοκιμασίες ταυτοποίησης. Στο πρώτο στέλεχος Μυκοβακτηρίδιο που απομονώθηκε από κάθε ασθενή ελέγχτηκε η αντοχή του στα φάρμακα με τη μέθοδο αναλογιών και με τις μοριακές δοκιμασίες GenoType MTDR*plus* and GenoType MTDR*sl*. Κατά τη διάρκεια της μελέτης έγινε αξιολόγηση της άμεσης εφαρμογής τριών εμπορικών μεθόδων ανίχνευσης σε κλινικά δείγματα. Καταγράφηκαν τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με φυματίωση, χωρίζοντάς τους σε δύο βασικές ομάδες (Έλληνες και μετανάστες) για καλύτερη σύγκριση των δεδομένων. (2,9,15,59,61,70,144,174)

## 2.2. Βασική Επεξεργασία Δειγμάτων

Η επεξεργασία των δειγμάτων έχει σκοπό την ρευστοποίηση και ομογενοποίηση τους, την ελαχιστοποίηση της συνυπάρχουσας χλωρίδας και την συγκέντρωση μεγάλου αριθμού μυκοβακτηριδίων σε μικρό όγκο με φυγοκέντρωση, ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία των διαφόρων μεθόδων απομόνωσης.

Λαμβάνονταν δείγματα, ύποπτα για μυκοβακτηρίδια από το ΠΑΓΝΗ, όπως και από τα υπόλοιπα μέρη της Κρήτης,. Για την καταστροφή των κοινών βακτηρίων, τα δείγματα με χλωρίδα επεξεργάστηκαν με 2%NaOH και με το βλενολυτικό παράγοντα N-acetyl-L-cysteine για ρευστοποίηση της βλέννας. Βλ.αναλυτικό πρωτόκολλο 1 (199)

Ακολούθησε η εφαρμογή του παρακάτω αλγόριθμο:

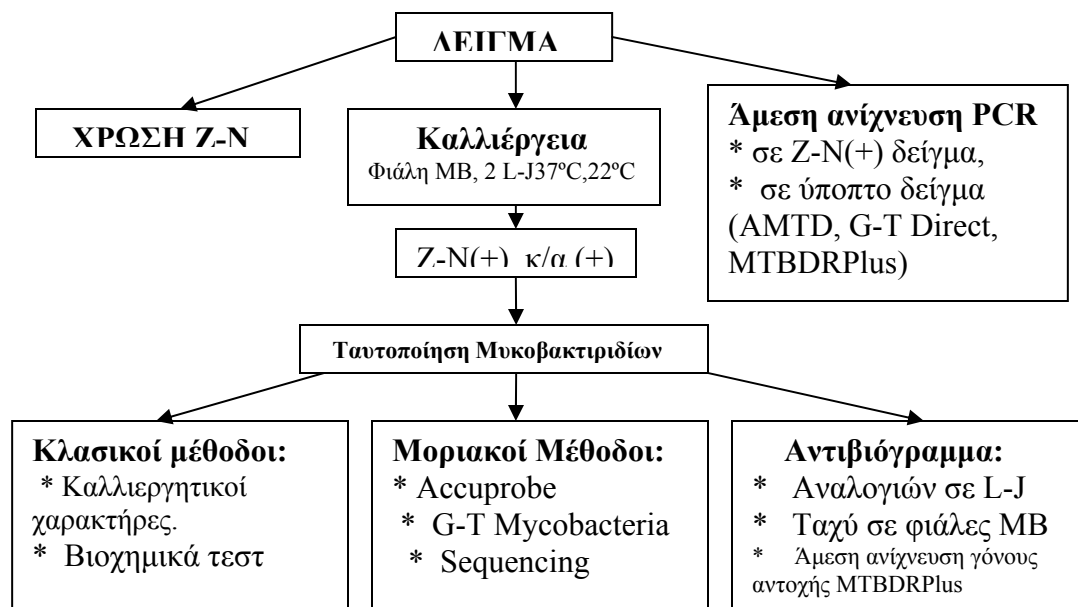
Ο συνδυασμός κλασικών και σύγχρονων μεθόδων που εφαρμόστηκε:

- **Μικροσκοπική εξέταση** κατά Ziehl-Neelsen.
- **Στερεή καλλιέργεια** σε υλικό Lowenstein-Jensen.
- **Υγρή καλλιέργεια** με το αυτοματοποιημένο BacT/AlerT 3D
- **Ανίχνευση του μυκοβακτηριδίου άμεσα από δείγμα με μοριακοί μέθοδοι (AMTD-GenProbe, GenoType Mycobacteria Direct-Hein Life Science, GenoTypeMTBDRPlus-Hein Life Science).**  
(62, 85,92,99,101,110,115,130)
- **Ταυτοποίηση** με εφαρμογή κλασσικών και κυρίως με μοριακών, εμπορικά διαθέσιμων τεχνικών (Accu Probe, GenoType MTBC, GenoType Mycobacteria CM και AS)  
(35,42,63,66,104,105,112,121,129,133)

- Έλεγχος ευαισθησίας με συνδυασμό κλασσικών και μοριακών τεχνικών: κλασσική μέθοδος αναλογιών Canetti σε στερεό υλικό Lowenstein-Jensen, ταχύ μέθοδος αναλογιών στο αυτοματοποιημένο σύστημα BacT/AlerT 3D και με τη μοριακή τεχνική GenoType MTB DRPlus. (20,24,27,36,37,78,79,127)

Εικόνα 1.

**ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ**



### 2.3.A ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ

#### A-1. Μικροσκοπικός έλεγχος με οξεάντοχη χρώση Ziehl-Nielsen (Z-N).

Το πρώτο βακτηριολογικό στοιχείο της παρουσίας μυκοβακτηριδίων στα κλινικά δείγματα είναι η ανίχνευση οξεάντοχων βακτηριδίων στα παρασκευάσματα για μικροσκοπική εξέταση. Έχει εκτιμηθεί, ότι για να γίνει ανίχνευση οξεάντοχων βακτηριδίων, θα πρέπει να υπάρχουν 5000-10000 μυκοβακτηριδίων ανά ml δείγματος επιτρέπει και να μελετηθούν περίπου 300 οπτικά πεδία. Επίσης, δίνει ποσοτική εκτίμηση του αριθμού των βακτηρίων που αποβάλλονται. Παίζει ρόλο και στον έλεγχο της αντιβακτηριδιακής θεραπείας. Τα μυκοβακτηρίδια δύσκολα χρωματίζονται. Τα λιπίδια στο κυτταρικό τους τοίχωμα εμποδίζουν τη βαφή με σύνηθες χρωστικές (π.χ. Gram). Γι αυτό τα μυκοβακτηρίδια στη Gram μπορεί να είναι διαφανή, είτε να φαίνονται σαν σκιές, είτε να εμφανίζονται σαν Gram (+) βακτήρια. Είναι ικανά να δημιουργούν σταθερές ενώσεις με μερικές χρώσεις όπως φουξίνη και ουραμίνη. Η φαινόλη επιτρέπει διείσδυση της χρωστικής. Το μυκολικό οξύ του κυτταρικού τοιχώματος συγκρατεί την πρώτη χρωστική ακόμα και μετά την έκθεση του σε οξυνόμενο οινόπνευμα ή σε δυνατό οξύ. Λόγω αυτής της αντιστάσεως στον αποχρωματισμό με οξύ, χαρακτηρίζονται οξεάντοχα βακτηρίδια. Στο πεδίο που γίνεται η αναγνώριση των μυκοβακτηριδίων χρησιμοποιείται αντίστροφη χρώση (π.χ. Methylene blue). Για την οξεάντοχη χρώση χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο carbofuchsin: Z-N, στο πλακάκι με το ίζημα όλων των δειγμάτων. (πρτ.2)

## **A-2. Καλλιέργεια σε ειδικά θρεπτικά υλικά.**

Το ίζημα όλων των δειγμάτων εμβολιάστηκε σε δύο στερεά υλικά και σε ένα υγρό υλικό για καλλιέργεια με μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία. Έχει ικανότητα ανίχνευσης πάνω από 10 βακτηρίδια ανά ml υλικό.

α) Υγρό υλικό Middlebrook 7H12 σε φιάλες με πρόσθετο συνδυασμό αντιβιοτικών. Χρησιμοποιήσαμε την αυτοματοποιημένη χρωματομετρική μέθοδος της Bact/Alert 3D, όπου η παραγωγή CO<sub>2</sub> από το μυκοβακτηρίδιο που αναπτύσσεται αλλάζει το χρωματομετρικό δείκτη ευαισθησίας στο αέριο που βρίσκεται στο πάτο της φιάλης. Το μόνιτορ κάνει τον έλεγχο κάθε 10 λεπτά. Όταν σημάνει θετικό σήμα έχουμε ανάπτυξη βακτηριδίων αντίστοιχο των 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>/ml. Η μέθοδος μειώνει το χρόνο επώασης που απαιτείται για την ανίχνευση των αναπτυσσόμενων μυκοβακτηριδίων περίπου στο μισό απ ότι στα στερεά θρεπτικά.(πρτ.3).

β) Στερεό υλικό Lowenstein-Jensen: παρατεταμένος χρόνος επώασης των καλλιιεργειών (6-8 εβδομάδες).

## **A-3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης σε κλινικά δείγματα.**

Χαρακτηρίζονται από την δυνατότητα να δίνουν θετικό αποτέλεσμα σε μικρή συγκέντρωση βακίλων, για λιγότερο από 48 ώρες. Είναι δοκιμασίες ανίχνευσης του *M. tuberculosis* και στοχεύουν το γενετικό του υλικό άμεσα από δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε σε περιπτώσεις με θετικά οξεάντοχα επιχρίσματα ή όπου η υποψία για φυματίωση ήταν μεγάλη. Ανεξαρτήτως των αποτελεσμάτων της μοριακής δοκιμασίας, συνεχίστηκε η απομόνωση του βακτηριδίου από το κλινικό δείγμα, ώστε να γίνει στη συνέχεια η ταυτοποίηση και ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιφυματικά φάρμακα. Οι μοριακές αυτές τεχνικές έχουν ως μεθοδολογίες τον γονιδιακό πολλαπλασιασμό (Nucleic acid

amplification, NAA). Έγινε μελέτη και εκτίμηση τριών βασικών μεθόδων στο εργαστήριό μας με στόχο: να δίνουν αποτέλεσμα σε μικρή συγκέντρωση βακτηριδίων σε λιγότερο από 48 ώρες και να χρησιμοποιούνται σε διαφορετικά κλινικά δείγματα (8,10,21,44,58,64,143,170,200)

#### **α ) Πρώτη μέθοδος: AMTD (Transcription-Mediated Amplification)**

*Αρχή της μεθόδου:*

Βασίζεται στη μεθοδολογία TMA (Transcription Mediated amplification), όπου πολλαπλασιάζεται ο ειδικός στόχος με ενδιάμεσα DNA προϊόντα. Η ανίχνευση των αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου πραγματοποιείται με υβριδισμό των νουκλεϊκών οξέων και ανίχνευση του υβριδίου με χημιφωταύγεια.

- Έχει στόχο το ριβοσωμιακό RNA(16S rRNA)
- Ισοθερμικός πολλαπλασιασμός στους 42°C χωρίς τη χρήση κυκλοποιητή.
- Όλη η διαδικασία ολοκληρώνεται σε ένα σωληνάριο (single tube test)

Η ικανότητα ανίχνευσης είναι <1000 αντίγραφα rRNA, ποσότητα ισοδύναμη με 1-5 μυκοβακτηρίδια στα κλινικά δείγματα. Η τεχνική είναι αναγνωρισμένη από το FDA για τη χρήση της σε θετικά και αρνητικά για οξεάντοχα βακτήρια δείγματα από ασθενείς με υποψία φυματίωσης. (11,25,28,56,138,209). **(πρτ 4)**

#### **β ) Δεύτερη μέθοδος: GenoType Mycobacteria Direct v.4.0 A(μέθοδος NASBA)**

Εφαρμόζεται σε ασθενείς με υποψία πνευμονικής και εξωπνευμονικής φυματίωσης, που δεν έχουν λάβει αντιφυματική αγωγή τους τελευταίους 12 μήνες, ή που έχουν λάβει για λιγότερο από 7 ημέρες.



*Αρχή της μεθόδου:* βασίζεται στην ανατροφοδοτούμενη αντιγραφή αλληλουχιών μεταγραφής RNA (Self-sustained Replication, 3SR). Στην αντίδραση 3SR χρησιμοποιείται η RNάση H για να αποδομήσει τα διμερή RNA-DNA, επιτρέποντας έτσι τη μετατροπή τους σε DNA διπλής έλικας με ένα σημείο πρόσδεσης RNA πολυμεράσης στο κάθε άκρο τους. Στη συνέχεια, το διπλής έλικας DNA λειτουργεί ως μήτρα για τη σύνθεση μορίου RNA που εισέρχεται στην αντίδραση. (38, 163). **(πρτ.5)**

- Ταυτόχρονα ανιχνεύει 5 βασικά μυκοβακτηρίδια από κλινικά δείγματα (*M. tb.c.*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmonse*)
- Χρησιμοποιεί μαγνητικά σφαιρίδια στην απομόνωση του RNA
- Συνδυάζει τον ισοθερμικό πολλαπλασιασμό σεσημασμένων με βιοτινυλισμένων εκκινητών RNA μορίων, με τον ανάστροφο υβριδισμό σε ταινίες νιτροκυτταρίνης (DNA-strip)

#### *Ερμηνεία αποτελεσμάτων*

Conjugate Control (CC) - πιστοποιεί την αποτελεσματικότητα της ένωσης με το conjugate και το υπόστρωμα.

Amplification Control (AC) - ανιχνεύει τυχόν λάθη στην απομόνωση και αναστολές του πολλαπλασιασμού.

Πέντε σημεία δράσεις: 3. *M. avium*

4. *M. intracellulare*

5. *M. kansasii*

6. *M. malmonse*

7. *M. tuberculosis complex*

**γ ) Τρίτη μέθοδος: GenoType MTBDRPlus (Hein-Lifescience) για ανίχνευση του *M.tuberculosis complex* και γόνους αντοχής στη Ριφαμπικίνη και Ισονιαζίδη.**

*Αρχή της μεθόδου:* Βασίζεται στη μέθοδο ανιχνευτών (probes) γραμμικής διάταξης σε ταινίες νιτροκυτταρίνης, των οποίων η αλληλουχία είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία στόχου και είναι σεσημασμένα με βιοτίνη. Περιλαμβάνει πολλαπλασιασμό με PCR γενετικού υλικού εξαχθέντος από κλινικό δείγμα ή από θετική στερεή ή υγρή καλλιέργεια. Ακολουθεί υβριδισμός μεταξύ στόχου και ανιχνευτή και σχηματισμός υβριδοποιημένου μορίου, το οποίο ανιχνεύεται με την παραγωγή έγχρωμου σημείου. Ανιχνεύει ταυτόχρονα το *M. tuberculosis complex* και την αντοχή στις Ριφαμπικίνη και Ισονιαζίδη από δείγματα ή από καλλιέργεια. Η ανίχνευση αντοχής στην Ριφαμπικίνη >96% αφορά τις συχνότερες μεταλλάξεις στο *rrxB* γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί για την β-υποομάδα της RNA πολυμεράσης. Η ανίχνευση αντοχής στην Ισονιαζίδη αφορά τις συχνότερες μεταλλάξεις στο *katG* και *inhA* γονίδια 75-80%. Συγκεκριμένα το γονίδιο *katG* κωδικοποιεί για την καταλάση- υπεροξειδάση και το γονίδιο *inhA* κωδικοποιεί την παραγωγή της μυκοβακτηριακής ενούλ-ACP ρεδουκτάσης η οποία εμποδίζει την ανασταλτική δράση του φαρμάκου. (23,116,165,180,188,189,210) **(πρτ.6)**

*Ερμηνεία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.*

Κάθε ταινία έχει συνολικά 27σημεία (ζώνες) δράσης.

Conjugate Control (CC) πρώτη γραμμή πιστοποιεί την αποτελεσματικότητα της ένωσης με το Conjugate και το υπόστρωμα.

Amplification control (AC) δεύτερη γραμμή πιστοποιεί την αποτελεσματικότητα του πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού (π.χ. ύπαρξη αναστολείς).

M.tuberculosis complex (TUB)→τρίτη ζώνη υβριδοποιεί τα PCR προϊόντα όλων των στελεχών του συμπλέγματος Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης.

rpoB Locus Control → ανιχνεύει την περιοχή ειδική για το rpoB γονίδιο και πρέπει πάντα να είναι θετική.

rpoB wild type probes 1-8 (rpoB WT1-WT8) → συμπεριλαμβάνει και αναλύει τις βασικές περιοχές ανθεκτικότητας (ξεχωριστά κωδικόνια) στη Ριφαμπισίνη. Απουσία σήματος τουλάχιστον ενός αρχέγονου στελέχους από 1 έως 8, σηματοδοτεί αντοχή του εξεταζόμενου μυκοβακτηριδίου.

rpoB mutations probes: 1(rpoBMUT1=D516V)

2A (rpoBMUT2A=H526Y)

2B (rpoBMUT2B=H526D)

3(rpoBMUT 3=S531L)

katG Locus Control- ανιχνεύει την περιοχή ειδική για το γονίδιο katG, του οποίου το σήμα είναι πάντα θετικό.

katG wild type probe (katG WT1) - συμπεριλαμβάνει τη βασική περιοχή ανθεκτικότητας στη Ισονιαζίδη. Απουσία σήματος του αρχέγονου στελέχους σηματοδοτεί αντοχή στην Ισονιαζίδη.

katG mutation probes: 1(katG MUT1=S315T1)

2(katG MUT2=S315T2)

inhA Locus Control - ανιχνεύει την περιοχή ειδική για το inhA γονιδίου που είναι πάντα θετική.

inhA wild type probes: 1 και 2, (katG WT1+katG WT2) αναλύει βασικά κωδικόνια μετάλλαξης στην Ισονιαζίδη.

inhA mutation probes: 1 (*inhA* MUT1=C15T)

2 (*inhA* MUT2=A16G)

3A (*inhA* MUT3A=T8C)

3B (*inhA* MUT3B=T8A)

### 2.3.B. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ

Το γένος *Mycobacterium* περιέχει πάνω από 130 διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, τα οποία εμφανίζονται όμοια σε οξείαντοχη χρώση. Τα μυκοβακτηρίδια είναι λεπτά, μη σπορογόνα, ακίνητα, αερόβια βακτήρια, που χρωματίζονται Gram χρώση.

#### B-1. Καλλιεργητικοί χαρακτήρες (βιοτυπία)

- ✓ Ταχύτητα ανάπτυξης: <7 ημέρες- ομάδα Ταχέως αναπτυσσόμενα, >7 ημέρες- ομάδες Βραδέως αναπτυσσόμενα (Μη χρωμογόνα, Φωτοχρωμογόνα, Σκοτοχρωμογόνα)
- ✓ Θερμοκρασία ανάπτυξης: στους 37°C, 25°C, 42°C
- ✓ Σχήμα, χρώμα αποικιών και αντίδραση στο φως με παραγωγή χρωστικής.

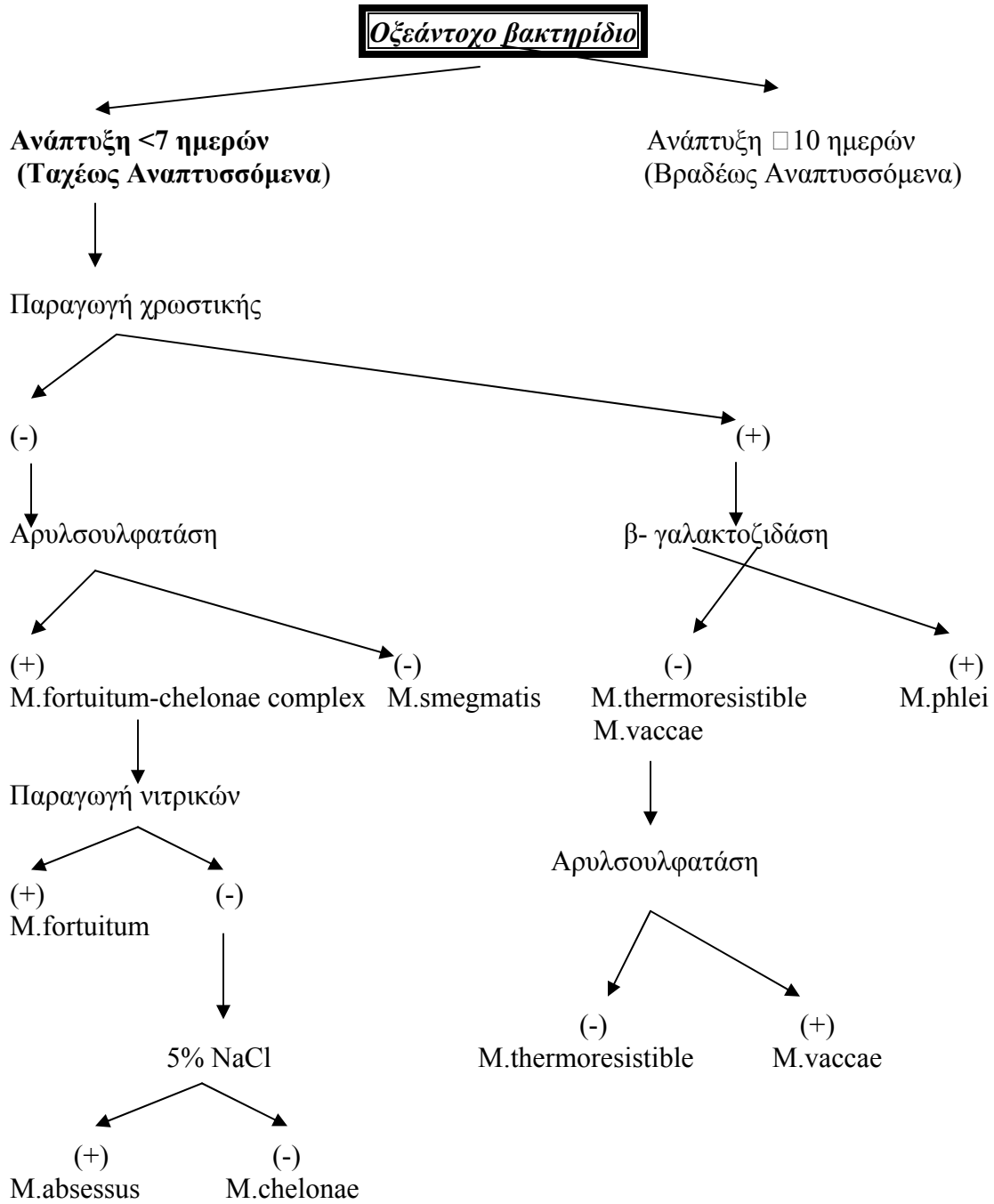
#### B-2. Βιοχημικές ιδιότητες (φαινοτυπία),

- ✓ Παραγωγή νιασίνης
- ✓ Αναγωγή νιτρικών
- ✓ Παραγωγή καταλάσης
- ✓ Δοκιμή ευαισθησίας στη TCH (thiofen-2-carboxylic acid hidrazide)
- ✓ Δοκιμή Αρυλσουλφατάσης
- ✓ Παραγωγή ουρεάσης
- ✓ Υδρόλυσης Tween 80
- ✓ Ανάπτυξη σε υλικό Mc Conkey χωρίς crystal violet. (πρτ.7)

Ιστορικά, το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης τυποποιείται από τις ανώμαλες, άχρωμες, σχοινοειδής αποικίες, από το θετικό τεστ νιασίνης, θετικό τεστ αναγωγής νιτρικών και ανθεκτικότητα στη T2CH.

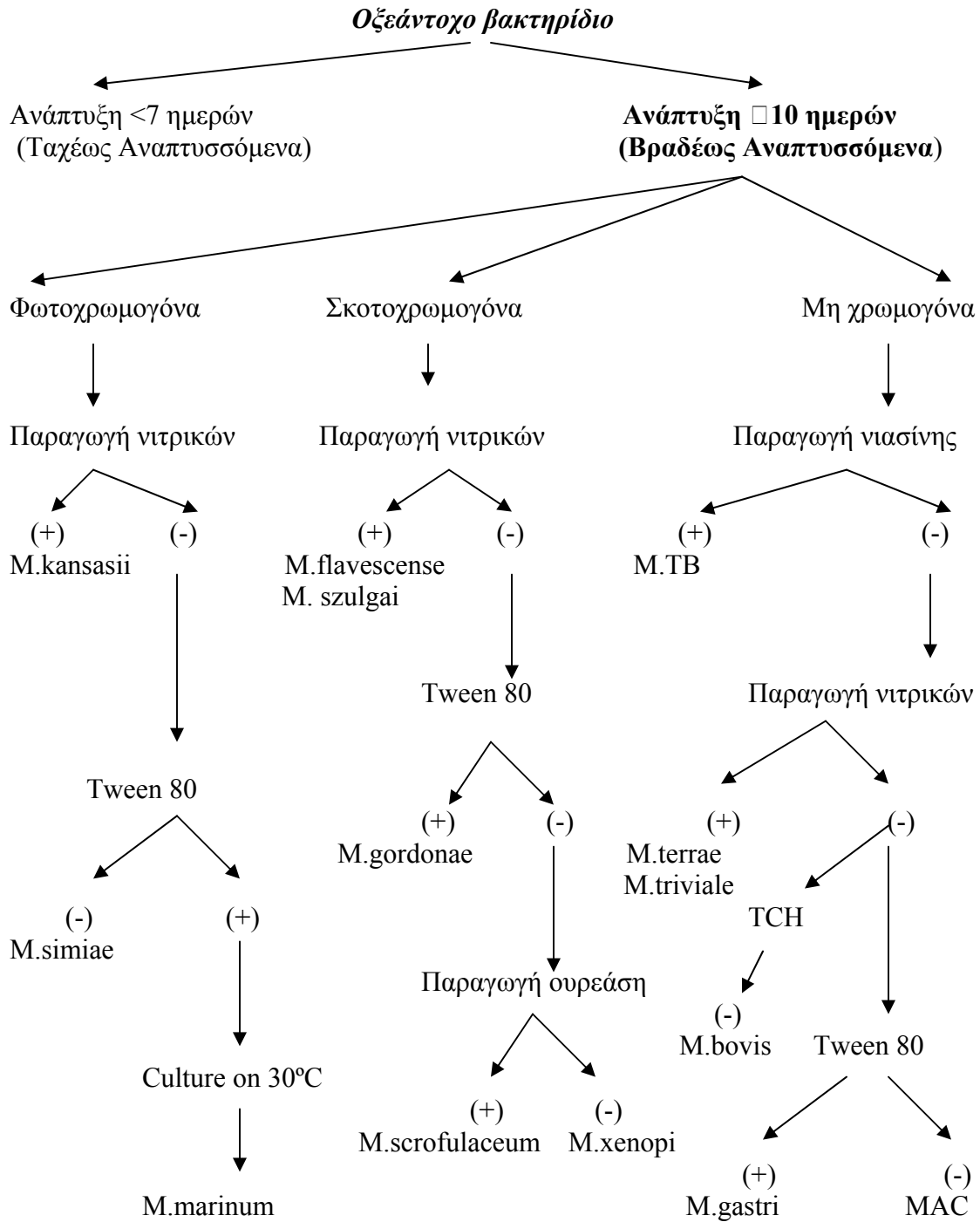
Εικόνα 2.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΑΧΕΩΣ  
ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ



Εικόνα 3.

**ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΡΑΔΕΩΣ  
ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ**



### B-3. Μοριακές δοκιμασίες ταυτοποίησης μυκοβακτηριδίων (Γονοτυπία)

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μοριακές δοκιμασίες ταυτοποίησης που στηρίζονται στις διαφορές που υπάρχουν στο γενετικό υλικό των μυκοβακτηριδίων.

Η εφαρμογή τους δίνει σημαντική βοήθεια στην εργαστηριακή διάγνωση της φυματίωσης και των άλλων μυκοβακτηριώσεων, συμπληρώνοντας ή αντικαθιστώντας κλασικές συμβατικές τεχνικές.

α ) Μέθοδος DNA probes (Accuprobe): περιλαμβάνει τον άμεσο υβριδισμό γονιδίου, χαρακτηριστικό για συγκεκριμένο είδος μυκοβακτηριδίου με ειδικούς ιχνηθέτες, σεσημασμένους με ακριδίνη. Τα κύτταρα των μυκοβακτηριδίων λύνονται με υπέρηχους, θερμαίνονται στους 95°C για διάσπαση των αλυσίδων του DNA, εκτίθενται στο DNA ιχνηθέτη, σεσημασμένο με εστέρες της ακριδίνης. Αυτός θα ενωθεί με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του RNA για να σχηματιστεί σταθερό DNA-RNA υβρίδιο. Επιλεγμένο αντιδραστήριο «σκοτώνει» το σήμα στο μη συνδεδεμένο DNA. Ο χημικός φωτισμός που παράγεται από το DNA-RNA υβρίδιο μετράται στο λουμινόμετρο και εκφράζεται σε μονάδες φωτός.

Με την μέθοδο αυτή τυποποιούνται τα ακόλουθα είδη Μυκοβακτηριδίων: *M. tb.complex*, *M. avium complex*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*.

Χρησιμοποιείται καλλιέργεια λιγότερη του ενός μηνός από στερεό υλικό ή από φιάλη MB/Bact Alert 3D. ( **πρτ.8** ) (96,148,162)



β ) Μέθοδος DNA strip: βασίζεται στον αντίστροφο υβριδισμό των PCR προϊόντων στους συμπληρωματικούς ιχνηθέτες (probes). Γίνεται πολλαπλασιασμός μέσω της PCR της αλληλουχίας 16S-23S rRNA κοινών για όλα τα είδη του γένους *Mycobacterium*. Ακολουθεί υβριδισμός με ιχνηθέτες, που είναι προσκολλημένοι σε ταινίες νιτροκυτταρίνης (σε διαφορετικές θέσεις στην ταινία), που αντιστοιχούν στο συγκεκριμένο είδος. Τα μυκοβακτηρίδια που τυποποιήθηκαν με αυτή τη μέθοδο, ακολούθησαν συγκεκριμένη πορεία. Πρώτα ελέγχθηκαν με το σύστημα GenoType *Mycobacterium* CM (Common *Mycobacterium*), όπου διαφοροποιήθηκαν 15 πιο συνήθη μυκοβακτηρίδια, συμπεριλαμβανομένου και του συμπλέγματος *M. tuberculosis*.

Όταν τυποποιήθηκε το *M. tuberculosis complex*, έγινε περαιτέρω έλεγχος με το σύστημα GenoType MTBC, όπου το *M. tb.complex* διαφοροποιήθηκε σε *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis ssp.caprae*, *BCG*, *M. microti*, *M. africanum*, που συγκροτούν το *Mycobacterium tuberculosis complex*. Σε περιπτώσεις μη ταυτοποίησης με το σύστημα για τα συνήθη μυκοβακτηρίδια (common mycobacteria), έγινε στη συνέχεια έλεγχος με το σύστημα GenoType AS (Additional species). Το AS (Συμπληρωματικά μυκοβακτηρίδια) διαφοροποιεί άλλα 16 μυκοβακτηρίδια. Συνολικά η δυνατότητα του GenoType *Mycobacterium* DNA strip test διαφοροποιεί 35 είδη μυκοβακτηριδίων. **(πρτ. 9)**  
(150,151,152,154,158,161,182,185,)

γ) Σε περιπτώσεις ανίχνευσης νέων ειδών, έγινε περαιτέρω μοριακός χαρακτηρισμός με τη μεθοδολογία *sequencing*. Χρησιμοποιήθηκε η μοριακή μέθοδος αναφοράς: προσδιορισμός της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου μετά από PCR

### **2.3.Γ. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΟΧΩΝ ΣΤΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ**

#### **Γ-1. Έλεγχος ευαισθησίας του Μυκοβακτηριδίου της φυματιώσεως**

Η τεχνική της δοκιμής ευαισθησίας για τα μυκοβακτηρίδια διαφέρει από την τεχνική που χρησιμοποιείται για τα άλλα βακτήρια. Οι βασικοί λόγοι είναι ο βραδύς ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου και η αδυναμία παρασκευής ομοιογενούς εναιωρήματος λόγω του λιπαρού, υδρόφοβου κυτταρικού τοιχώματος.

α ) *TAXY ANTIBIOΓΡΑΜΜΑ*: Με τη μέθοδο αναλογιών σε υγρό υλικό 7 H 12 Middlebrook, όπου χρησιμοποιείται η χρωματομετρική μέθοδος, αντί να μετρούνται αποικίες, η ανάγνωση των αποτελεσμάτων (ευαίσθητο- αρνητικό) γίνεται αυτοματοποιημένα με το σύστημα BACT/ALERT 3D.

Ο έλεγχος έγινε για τα 4 βασικά αντιφυματικά φάρμακα: RIFAMPICIN, ISONIAZID, ETHAMBUTOL, STREPTOMYCIN. (πρτ.10).

β ) *ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ*: Με τη μέθοδο αναλογιών σε στερεό υλικό Löwenstein-Jensen. Η αρχή της μεθόδου είναι:

Γνωστή συγκέντρωση αντιφυματικού φάρμακου ενσωματώνεται σε στερεό θρεπτικό υλικό. Διασπείρεται άπ αυτο ποσότητα από εναιώρημα του μυκοβακτηριδίου που να δίνει 100-300 αποικίες στο υλικό χωρίς αντιβιοτικό (μάρτυρας). Αν το μυκοβακτηρίδιο είναι ευαίσθητο σε ένα αντιβιοτικό, ο αριθμός των αποικιών θα μειωθεί κατά 99%, ή δεν θα αναπτυχθεί καθόλου. Αντιβιοτικά που εξετάστηκαν και οι συγκεντρώσεις τους: ISONIAZID (0,2μg/ml, 1,0μg/ml, RIFAMPICIN (20μl/, 40μl/ml), ETHAMBUTOL (2μg/ml, 3μl/ml), STREPTOMYCIN (4μl/ml), PYRAZINAMID (200μg/ml, pH4,8), P.A.S. (0,5μg/ml, 1μg/ml). Προσδιορίστηκε η ανάπτυξη βακτηριδίων σε υλικά με διαφορετική πυκνότητα αντιφυματικού φαρμάκου και συγκρίθηκε με τον αριθμό ανάπτυξης στο μάρτυρα. Η αναλογία εκφράστηκε ως % επί του ολικού μικροβιακού πληθυσμού: 1% είναι το σημείο διαχωρισμού του ανθεκτικού πληθυσμού από τον ευαίσθητο.

Έλεγχος στα δεύτερης γραμμής αντιφυματικά έγινε μόνο σε ανθεκτικά βακτηρίδια.

**(πρτ.11)**

γ ) *ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ*:

- *MTBDRPlus assay*: αναζήτηση γόνων αντοχής στη RIFAMPICIN και ISONIAZID του M.tb.complex για τον προσδιορισμό των πολυανθεκτικών στελεχών: MultidrugResistant Tuberculosis (MDRTB) με την τεχνολογία DNA strip. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή του ανάστροφου υβριδισμού και ανιχνεύει τις συχνότερες μεταλλάξεις στο

υπεύθυνο για την αντοχή στη Rifampicin γροβ γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί τη β-υποομάδα της DNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης. Ανάλογα με τους ιχνηθέτες που υβριδοποιήθηκαν καθορίστηκε η ύπαρξη και η μετάλλαξη στο γροβ γονίδιο και επομένως, η ύπαρξη αντοχής στη Rifampicin (>96% των ανθεκτικών στη rifampicin M.tb., συνδέεται με μεταλλάξεις της περιοχής του γροβ γόνου). Με την δοκιμασία ελέγχθηκε και η αντοχή στην Isoniazid με μεταλλάξεις στο katG και inhA γονίδια, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του ένζυμου καταλάση-υπεροξειδάση για το μεν katG και του ένζυμου ενόυλ-ACP ρεδουκτάση. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια ενοχοποιούνται στο 80% των ανθεκτικών στελεχών. (πρτ. 6) (73,146,156,157,159,164)

- **MTBDRI's assay:** αναζήτηση γόνων αντοχής στις φλουοροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες (αμικασίνι, καναμυκίνη, καπρεομυκίνη) και εθαμβουτόλη με την τεχνολογία DNA και ανάστροφου υβριδισμού σε ταινίες νιτροκυτταρίνης. Η μέθοδος ανιχνεύει τους γόνους αντοχής στους: *gyrA* (δρά στην DNA γυράση), *rrs* (κωδικοποιεί την πρωτεινοσύνθεση του μικροβίου), και *embB* (κωδικοποιεί την αραβινοζύλ τρανσφεράση η οποία δρα στη σύνθεση μυκολικών οξέων). Οι μεταλλάξεις στους γόνους αντοχής *gyrA* (75-94%), στους γόνους αντοχής *rrs* (70%) και στους γόνους αντοχής *embB* (47-65%) ενοχοποιούνται για αντοχή στα αντίστοιχα αντιφυματικά φάρμακα. (πρτ. 6)

## **Γ-2. Έλεγχος ευαισθησίας στα Άτυπα Μυκοβακτηρίδια**

α ) Με τη μέθοδο αναλογιών σε Lowenstein-Jensen, για τα βραδέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια ( *M. kansasii*, *MAC*, *M. lentiflavum* κ.α.), όπως έχει περιγραφεί για το *M.tb.*(69,75,81,82,149,196) **(πρτ.11)**

β) Με τη μέθοδο E-test, για κάθε ομάδα μυκοβακτηριδίων, έγινε έλεγχος για τουλάχιστον 10 αντιβιοτικά.

Αρχή της μεθόδου: Ταινίες εμποτισμένες με αντιβιοτικό, όπου η συγκέντρωση του βρίσκεται καθ' όλο το μήκος της ταινίας σε υποδιπλάσιες αραιώσεις. Οι ταινίες τοποθετήθηκαν σε τριβλία με υλικό 7 H11 Middlebrook, εμπλουτισμένο με τον ενισχυτικό παράγοντα OADC, όπου έχει ενοφθαλμιστεί προηγουμένως μυκοβακτηριακό εναιώρημα. Μετά μια εβδομάδα επώασης, διαβάστηκε το σημείο της ταινίας, με συγκεκριμένη συγκέντρωση αντιβιοτικού (breakpoint), που καθορίζει το MIC του αντιβιοτικού.**(πρτ. 12 και13)**. (39,51,52,55,80,197,198,201,203)



## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**





## **ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ**

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΓΙΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ ΚΑΤΑ ΤΑ ΕΤΗ 2000-2007**

##### **3. Α. *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX**

**A-1. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑ ΚΛΙΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ  
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ  
ΚΑΘΕ ΤΜΗΜΑ**

**A-2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΤΟΥ  
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

**A-3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΣΘΕΝΩΝ  
ΜΕ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ**

**A-4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΚΑΙ ΥΓΡΑ  
ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

**A-5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ *M. TUBERCULOSIS***

**A-6. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΜΕΣΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ  
ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

**A-7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ  
*M. tuberculosis* με τη μέθοδο των αναλογιών (πρωτόκολλα 10 και 11)**

- **Μοριακή τεχνική ελέγχου αντοχής στα πρωτεύοντα αντιφυματικά  
φάρμακα INH και RMP (GenoType MTBDRPlus, πρωτ.6)**

- Μοριακή τεχνική ελέγχου αντοχής στα δευτερεύοντα αντιφυματικά φάρμακα όπως φλουοροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες και EMB (GenoType MTBDRsl, πρτ.6)

### 3. Β. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΠΟ ΑΤΥΠΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ 2000-2007 ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ

B-1. Κατανομή των δειγμάτων, στα οποία απομονώθηκαν άτυπα μυκοβακτηρίδια.

B-2. Διερεύνηση της ποικιλότητας των ειδών μυκοβακτηριδίων που απομονώθηκαν στο ΠΑΓΝΗ.

B-3 Δοκιμασίες ευαισθησίας στα αντιμυκοβακτηριακά φάρμακα.

### 3. Γ. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

### 3. Δ. ΣΠΑΝΙΑ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΥΡΓΙΑ ΕΙΔΗ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΟΥ ΠΑΓΝΗ

**Ταχέως αναπτυσσόμενα:**

Δ-1. *M. thermoresistible*:

Δ-2. *M. europaeum* (*M.GN-10643*)

Δ-3. *M. GN-11124* (*M.cretae*):

**Βραδέως αναπτυσσόμενα:**

Δ-4. *M. herakleense* (*GN<sub>01</sub>*):

Δ-5. *M. GN-9680*

Δ-6. *M. arupense*

- *M. GN- 9722*
- *M. GN-10546*

**3. Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ  
ΑΤΥΠΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ**

### 3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΓΙΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ ΚΑΤΑ ΤΑ ΕΤΗ 2000-2007

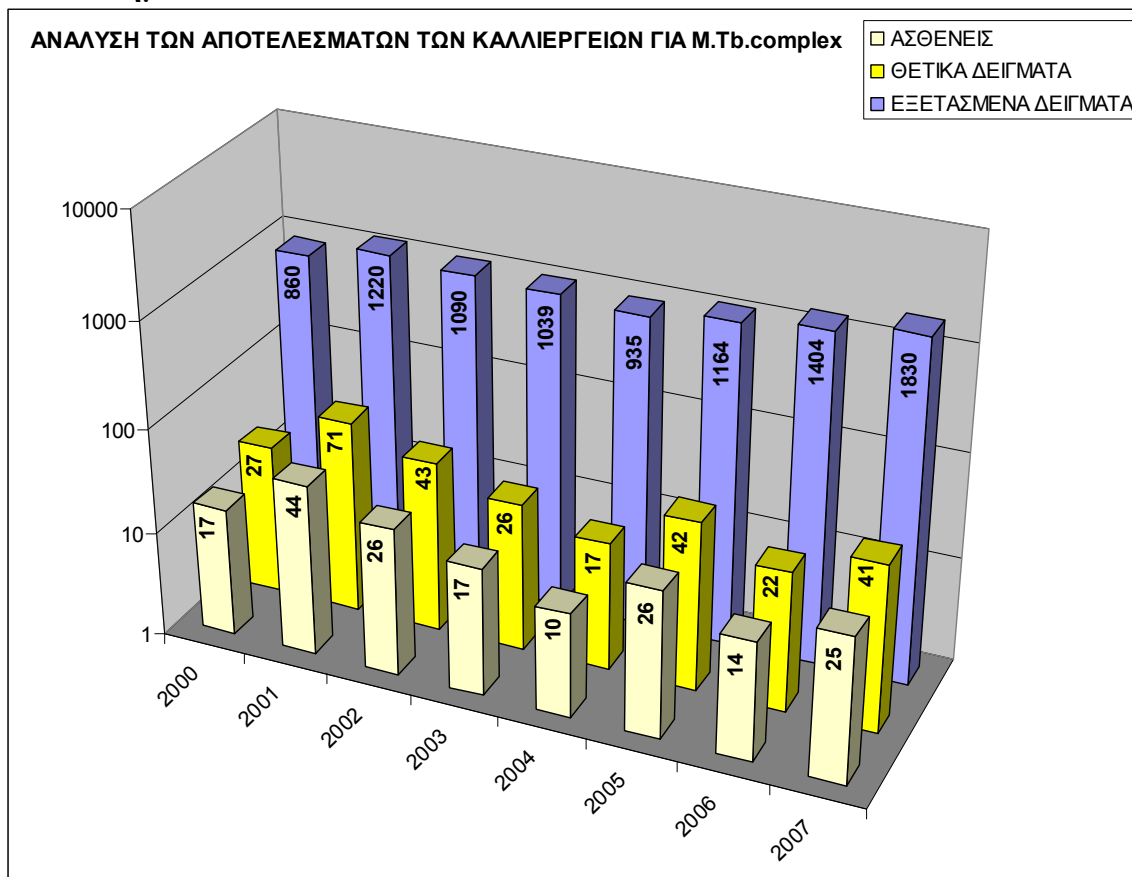
#### 3.A. *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX*

- Προσδιορισμός της επίπτωσης των θετικών καλλιιεργειών για *Mycobacterium tuberculosis complex* την περίοδο 2000-2007 επί του συνόλου των δειγμάτων.
- Ανάλυση του είδους των δειγμάτων.
- Αξιολόγηση της Ziehl-Neelsen.
- Σύγκριση του Αυτοματοποιημένου συστήματος ανίχνευσης MB/BacT Alert 3D με τη κλασσική μέθοδο Lowenstein-Jensen ως προς το χρόνο θετικοποίησή τους.

Αναλύθηκαν τα αποτελέσματα των καλλιιεργειών για βάκιλο του Κωχ κατά την περίοδο 1/01/2000-31/12/2007. Σύνολο 9542 δείγματα, κατά τη διάρκεια 8 ετών ελέχθησαν για μυκοβακτηρίδια. Συνολικά 289 καλλιέργειες ήταν θετικές για *M. tuberculosis complex*, δηλαδή το 3,02% των δειγμάτων ( **πίνακας 1**).

<b>Πίνακας 1. Αποτελέσματα των καλλιιεργειών για <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>.</b>				
Έτη	Εξετασθέντα δείγματα	Θετικά δείγματα	Αναλογία θετικών	Ασθενείς
2000	860	27	3,1%	17
2001	1220	71	5,8%	44
2002	1090	43	3,9%	26
2003	1039	26	2,5%	17
2004	935	17	1,8%	10
2005	1164	42	3,6%	26
2006	1404	22	1,5%	14
2007	1830	41	2,2%	25
Σύνολο	9542	289	<b>3,02%</b>	179

**Εικόνα 4. Ανάλυση των αποτελεσμάτων των καλλιιεργειών για *M.tb.complex* κατά το διάστημα 2000-2007**



Σύμφωνα με τον πίνακα 1, διαφαίνεται τάση αύξησης της ζήτησης δειγμάτων για φυματίωση τα τελευταία 3 χρόνια. Σχεδόν διπλασιάστηκαν τα δείγματα που εξετάστηκαν το 2007 σε σύγκριση με το 2004. Η ετήσια επίπτωση των θετικών δειγμάτων ήταν 3,1% το 2000 και το 2007 2,2%, με μέγιστη τιμή το 2001 (5,8%) και ελάχιστη τιμή το 2006 (1,5%), χωρίς να εμφανίζεται μεγάλη διαχρονική, ανοδική, ή πτωτική τάση.

**A-1. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑ ΚΛΙΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ  
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ  
ΚΑΘΕ ΤΜΗΜΑ**

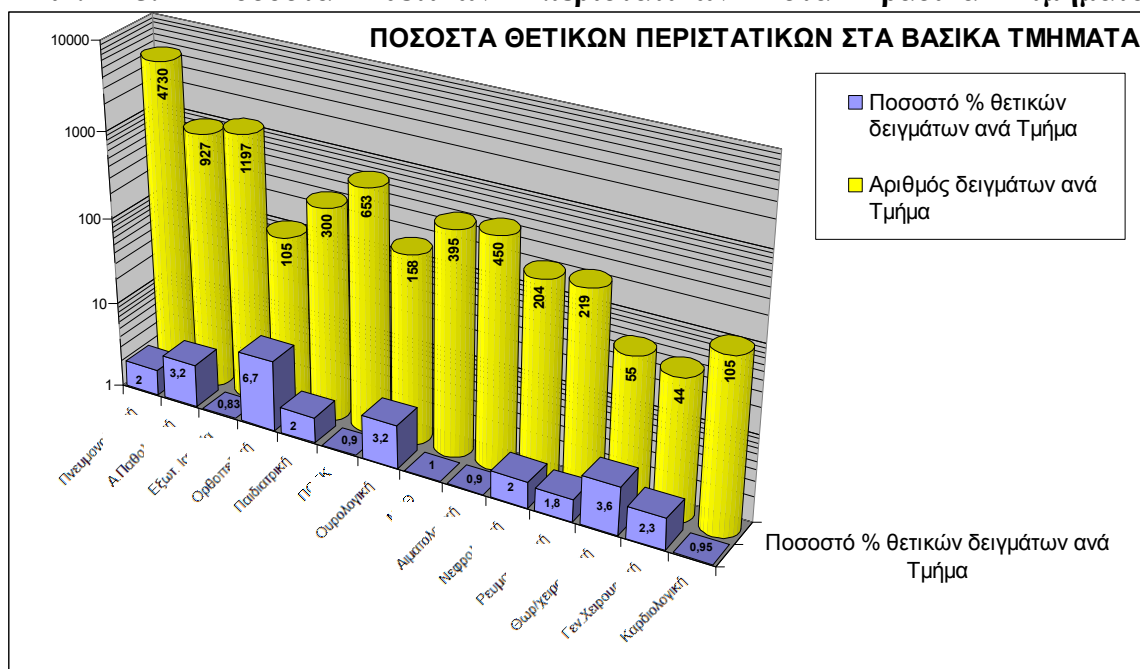
Ανάλυση του συνόλου των δειγμάτων ανάλογα με την κλινική από την οποία αποστέλλονταν, έδειξε ότι 4730 δείγματα (49,6%), προέρχονταν από την Πνευμονολογική κλινική, 1197 δείγματα (12,5%) από τα εξωτερικά ιατρεία, 927 δείγματα από την Α Παθολογική (9,7%) (**πίνακας 2**). Από το σύνολο 179 θετικών περιπτώσεων, 95 προέρχονταν από την Πνευμονολογική κλινική, 30 από την Α.Παθολογική, 10 από τα εξωτερικά ιατρεία, 7 από την ορθοπαιδική (**πίνακας 2**).

Τα ποσοστά των θετικών δειγμάτων για κάθε τμήμα ήταν: 2,0 % για τις Πνευμονολογική και Παιδιατρική, από 6,7% έως 2,3% για τις χειρουργικές, 2,0% για τη νεφρολογική (**Εικ.5**). Οι διαφορές είναι στατιστικά πολύ σημαντικές, με τις χειρουργικές και την Α.Παθολογική να έχουν τα περισσότερα ποσοστά θετικών δειγμάτων. Τα δείγματα από τις χειρουργικές κλινικές παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά θετικών, γεγονός που ερμηνεύεται από καλύτερα διαγνωστικά κριτήρια εντολής εξέτασης, ενώ στις Πνευμονικές και Παθολογικές, σε κάθε διαγνωστικό πρόβλημα επιδιώκεται ο αποκλεισμός της φυματίωσης.

<b>Πίνακας 2. Κατανομή και αναλογία θετικών δειγμάτων ανά κλινική.</b>				
<b>ΤΜΗΜΑ</b>	<b>Αριθμός δειγμάτων</b>	<b>Αναλογία %</b>	<b>Θετικές Περιπτώσεις</b>	<b>Αναλογία Θετικών %</b>
<b>Πνευμονολογική</b>	4730	49,6	95	2,0
<b>Α.Παθολογική</b>	927	9,7	30	3,2
<b>Εξωτ. Ιατρεία</b>	1197	12,5	10	0,83
<b>Ορθοπαιδική</b>	105	1,1	7	6,7
<b>Παιδιατρική</b>	300	3,1	6	2,0
<b>ΠΟΓΚ</b>	653	6,8	6	0,9
<b>Ουρολογική</b>	158	1,7	5	3,2
<b>ΜΕΘ</b>	395	4,1	4	1,0
<b>Αιματολογική</b>	450	4,7	4	0,9
<b>Νεφρολογική</b>	204	2,1	4	2,0
<b>Ρευματολογική</b>	219	2,3	4	1,8
<b>Θωρ/χειρουργική</b>	55	0,6	2	3,6
<b>Γεν.Χειρουργική</b>	44	0,5	1	2,3
<b>Καρδιολογική</b>	105	1,1	1	0,95



**Εικ. 5. Ποσοστά θετικών περιστατικών στα βασικά τμήματα.**



## **A-2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΤΟΥ**

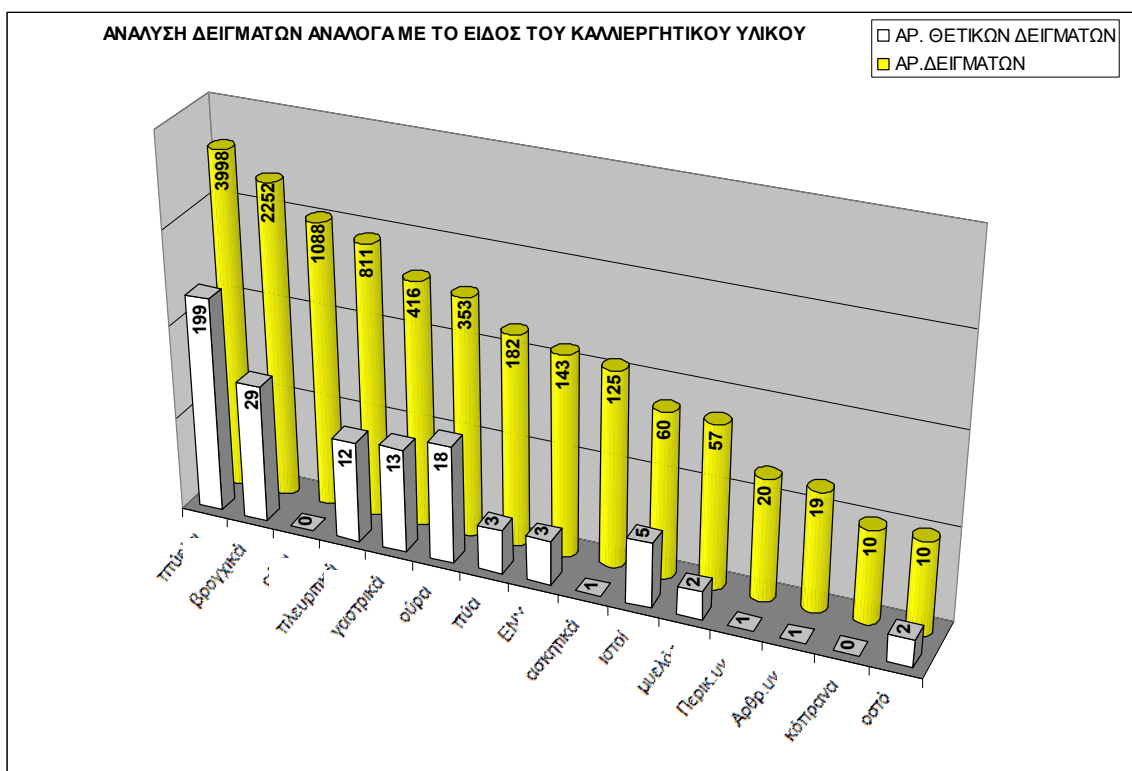
### **ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ**

Τόσο στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν, όσο και στα δείγματα που ήταν θετικά, το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν δείγματα από το αναπνευστικό, όπως και ήταν αναμενόμενο (πίνακας 3).

**Πίνακας 3. Αποτελέσματα ανά είδος παθολογικού δείγματος**

<b>Είδος δείγματος</b>	<b>Αριθμός δειγμάτων</b>	<b>Αναλογία (%)</b>	<b>Αριθμός θετικών δειγμάτων</b>	<b>Αναλογία (%) θετικών</b>
<b>πτύελα</b>	3998	41,9%	199	4,97%
<b>βρογχικά</b>	2252	23,6%	29	1,28%
<b>αίμα</b>	1088	11,4%	0	0%
<b>πλευριτικά</b>	811	8,5%	12	1,48%
<b>γαστρικά</b>	416	4,4%	13	3,1%
<b>ούρα</b>	353	3,7%	18	5,1%
<b>πύα</b>	182	1,9%	3	1,6%
<b>ΕΝΥ</b>	143	1,5%	3	2,1%
<b>ασκητικά</b>	125	1,3%	1	0,8%
<b>ιστοί</b>	60	0,6%	5	8,3%
<b>μυελός</b>	57	0,6%	2	3,5%
<b>Περικ.υγ.</b>	20	,2%	1	5%
<b>Αρθρ.υγ.</b>	19	,2%	1	5,2%
<b>κόπρανα</b>	10	,1%	0	0%
<b>οστό</b>	10	,1%	2	20%

**Εικ.6 Ανάλυση δειγμάτων ανάλογα με το είδος του καλλιεργητικού υλικού**



Από την ανάλυση διαφαίνεται ότι το σύνολο των δειγμάτων 3998 (41,9%) ήταν πτύελα και το 69,86% των δειγμάτων προέρχονταν από το αναπνευστικό σύστημα. Οι διαφορές στα ποσοστά των θετικών σε κάθε κατηγορία δείγματος ήταν στατιστικά λίαν σημαντικές, κυρίως λόγω του μεγάλου ποσοστού που παρατηρήθηκε στα δείγματα των οστών, 20%.

Αξιοσημείωτη βρέθηκε η αναλογία της θετικής άμεσης χρώσης επί των θετικών για TB δειγμάτων. Στα 186 από αυτά, η άμεση χρώση Z-N ήταν θετική, δηλαδή το 64,3%, υπογραμμίζοντας τη διαρκή αξία της χρήσης της στην αρχική διάγνωση της φυματίωσης (πίνακας 4).

<b>Πίνακας 4. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ ΑΜΕΣΗΣ ΟΞΕΑΝΤΟΧΗΣ ΧΡΩΣΗΣ Ziehl-Neelsen</b>			
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ	Z-N (+)	ΑΝΑΛΟΓΙΑ
ΘΕΤΙΚΑ	289	186	<b>64,3%</b>
ΣΥΝΟΛΟ	9542	186	1,94%

### A-3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

Στο σύνολο των 179 διαγνωσθεισών περιπτώσεων την α' περίοδο της μελέτης διεγνώσθησαν 104/179 (58%), ενώ τη β' περίοδο 75/179 (42%). (πίνακας 5)

<b>Πίνακας 5. Νέες βακτηριολογικά διαγνωσμένες περιπτώσεις TB ασθενών, περιόδων (2000-2003) και (2004-2007)</b>	
2000-2003	104 (58%)
2004-2007	75 (42%)
2000-2007	179 (100%)

Οι Έλληνες ασθενείς συνολικά ανέρχονται σε 132/179 (73,7%), ενώ οι μετανάστες σε 47/179 (26,3%). (πίνακας 6). Οι 47 μετανάστες προέρχονταν από 11 χώρες, συχνά από περιοχές με υψηλή επικράτηση της φυματίωσης ( 15 Βούλγαροι, 10 Ρουμάνοι, 9 Αλβανοί, 4 Γεωργιανοί, 2 Ουκρανοί, 2 Ινδοί, 1 Φιλανδός, 1 Κούρδος, 1 Κενυάτης, 1 από την Ουγκάντα και 1 Νιγηριανός. Ειδικότερα την α΄ περίοδο, οι Έλληνες ανέρχονται σε 87, αποτελώντας το 83,6% των ασθενών την συγκεκριμένη περίοδο και των 48,6% του συνολικού αριθμού της μελέτης. (πίνακας 6). Αντίθετα, την β΄ περιόδου, οι Έλληνες ασθενείς μειώνονται αριθμώντας 45, αποτελώντας δε το 60% του αριθμού των ασθενών της ίδιας περιόδου και το 25,1% του συνολικού αριθμού της μελέτης. (πίνακας 6).

Οι μετανάστες ασθενείς ανέρχονται σε 17 την α΄ περιόδου αποτελώντας το 9,5% των ασθενών (πίνακας 6) και το 16,4% του συνολικού αριθμού ασθενών (πίνακας 7). Ενώ τη β΄ περιόδου ανέρχονται σε 30, αποτελώντας το 40% του αριθμού της συγκεκριμένης περιόδου (πίνακας 7) και το 16,8% του συνολικού αριθμού ασθενών (πίνακας 6). Παρότι καταγράφηκε αύξηση των κρουσμάτων των αλλοδαπών ως απόλυτος αριθμός, η συσχέτιση των κρουσμάτων με τον αριθμό δειγμάτων τους που εξετάστηκαν, παρουσιάζει μείωση από 12,2% σε 6,4% λόγω της αυξημένης προσέλευσης αλλοδαπών ασθενών. Για τους Έλληνες ασθενείς όμως, η μείωση των κρουσμάτων συνοδεύτηκε από μικρή σχετικά μείωση της αναλογίας ασθενών προς αριθμό εξετασμένων δειγμάτων της ομάδας αυτής, (2,14% vs 1,54%). Από τον πίνακα γίνεται φανερό ότι η αύξηση των περιπτώσεων TB στους αλλοδαπούς είναι συνάρτηση του συνεχώς αυξανόμενο αριθμό των εξετασμένων δειγμάτων για ανίχνευση της νόσου. (πίνακας 7)

**Πίνακας 6. Βακτηριολογικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις TB μεταξύ Ελλήνων και μεταναστών κατά τη διάρκεια 2000-2007 και των υποπεριόδων: α' (2000-2003) και β' (2004-2007).**

ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΕΤΗ	ΕΛΛΗΝΕΣ N (%)	ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΣ N (%)
	2000-2007	132 (73, 7%)	47 (26,3%)
	α' περίοδος (2000-2003)	87 (48,6)	17 (9,5)
	β' περίοδος (2004-2007)	45 (25,1) (-23,5%)	30 (16,8) (+7,3%)

**Πίνακας 7. Βακτηριολογικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις TB μεταξύ Ελλήνων και μεταναστών ξεχωριστά για κάθε περίοδο.**

ΕΤΗ	Αριθμός Δειγμά- των	Σύνολο ασθενών (%)	Έλληνες			Μετανάστες		
			Αρ. δειγμά- των	Αρ. ασθενών (%)	Αναλο- γία (%)	Αρ. δειγμά- των	Αρ. ασθενών (%)	Αναλογία (%)
2000- 2003	4209	104 (100)	4070	87 (83,6%)	2,14%	139	17 (16,4%)	12,2%
2004- 2007	5333	75 (100)	4865	45 (60%)	1,54%	468	30 (40%)	6,4%

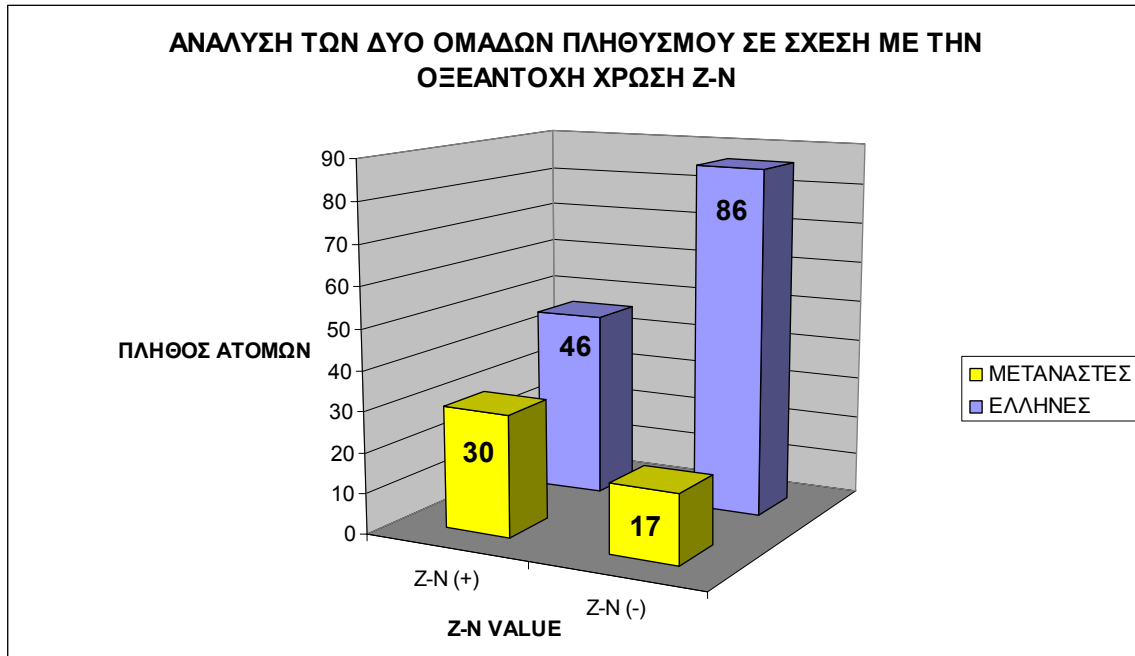
Η ανάλυση των θετικών δειγμάτων στη μελέτη δείχνει ότι το 80% (143/179), αφορούν το αναπνευστικό σύστημα και το 20% (36/179), είναι εξωπνευμονικά.

Θετική οξεάντοχη χρώση συνολικά βρέθηκε στα 76/179 (42,45%) των θετικών δειγμάτων (πίνακας 8), με τα δείγματα των Ελλήνων να είναι 34,8%, των δε μεταναστών 63,8%, υπογραμμίζοντας τη σπουδαιότητα της άμεσης χρώσης (πίνακας 9).

ΔΕΙΓΜΑ	Z-N (+)	Z-N (-)	
Πτύελα	55	46	N=143 (80%) Δείγματα αναπνευστικού
Βρογχικά	8	21	
Γαστρικά υγρά	6	7	
Πλευριτικά	1	11	N=36 (20%) Δείγματα εξωπνευμονικά
Ούρα	2	4	
Ιστός	1	4	
ΕΝΥ	1	2	
Πύα	1	2	
Οστό		2	
Μυελός των οστών	1	1	
Αρθρικό υγρό		1	
Ασκητικό υγρό		1	
Περικαρδικό υγρό		1	
ΣΥΝΟΛΟ	76	103	179
<b>Πίνακας 8. Ανάλυση θετικών δειγμάτων για <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>			

Ομάδες Ασθενών	Z-N (+)	Z-N (-)	ΣΥΝΟΛΟ
ΈΛΛΗΝΕΣ	46 (34,9%)	86 (65,1%)	132 (100%)
ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΣ	30 (63,8%)	17 (36,2%)	47 (100%)
ΣΥΝΟΛΟ	76 (42,5%)	103 (57,5%)	179 (100%)
<b>Πίνακας 9. Ανάλυση των δύο ομάδων πληθυσμού Ελλήνων και μεταναστών σε σχέση με την οξείαντοχη χρώση Z-N.</b>			

**Εικόνα 7. Ανάλυση των δύο ομάδων πληθυσμού (μετανάστες και έλληνες) σε σχέση με την οξεάντοχη χρώση Ziehl-Neelsen.**

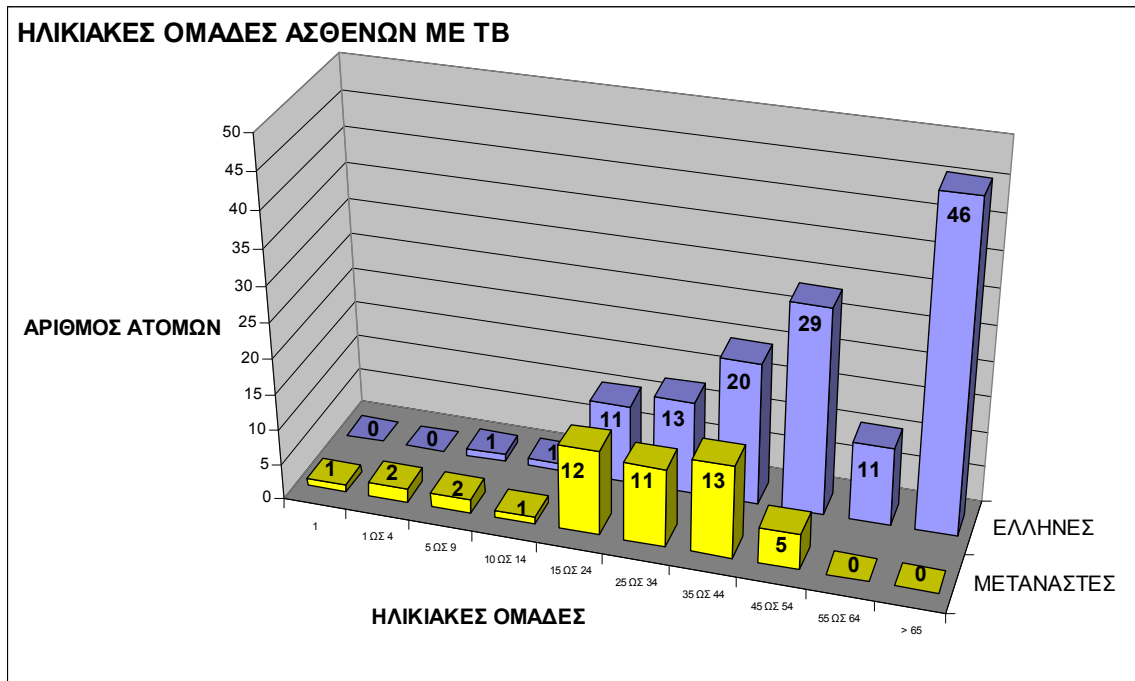


Η ηλικιακή κατανομή των ασθενών συνολικά με TB, δείχνει ότι το 63,7% ήταν στην πιο παραγωγική ηλικία των 15-54 ετών. Για τους Έλληνες, το 34,8% ήταν ηλικίας άνω των 65 ετών, ενώ 76,5% των μεταναστών ανήκαν στις ηλικίες από 15 έως 44 ετών.(πίνακας 10).

<b>Πίνακας 10. Ηλικιακές ομάδες ασθενών με TB</b>			
<b>Ηλικίες</b>	<b>Έλληνες</b>	<b>Μετανάστες</b>	<b>Σύνολο</b>
<b>1</b>		<b>1</b>	<b>1</b>
<b>1-4</b>		<b>2</b>	<b>2</b>
<b>5-9</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>10-14</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
15-24	11	12 (25,5%)	23
25-34	13	11 (23,4%)	24
35-44	20	13 (27,6%)	33
45-54	29 (22%)	5	34
55-64	11		11
>65	46 (34,8%)		46
<b>Σύνολο</b>	<b>132 (100%)</b>	<b>47 (100%)</b>	<b>179</b>



**Εικ.8. Ηλικιές ομάδες ασθενών με φυματίωση**



Η αναλογία Ανδρών vs. Γυναικών συνολικά ήταν: 128/179 (71,5%) και 51/179 (28,5%) αντίστοιχα. Έπιμέρους για τους Έλληνες ο λόγος Α/Γ βρέθηκε 2,2 (Α/91 vs. Γ/41) και για τους μετανάστες 3,7 (Α/37 vs. Γ/10).

Το επίπεδο μόρφωσης των ασθενών με ΤΒ δείχνει ότι το 61,8% ήχε βασική εκπαίδευση, το 27,5% - μεσαία και το 10,3% - ανώτατη. Η επαγγελματική ενασχόληση τους σε μεγαλύτερο ποσοστό ήταν η αγροτική και οικοδομική εργασία (44,7%), συνταξιούχοι του ΟΓΑ (25,1%). Το υπόλοιπο ποσοστό ασθενών διανέμεται ως έχει: δημόσιοι υπάλληλοι, άνεργοι, φυλακισμένοι, έμποροι, οικιακά, συνταξιούχοι από 3,17%, και εκπαιδευτικός, αρχαιολόγος, μηχανικός αυτοκινήτων, στρατιώτης, ταπετσίερης, μοναχή 11,2%. Παράγοντες κίνδυνου με την μεγαλύτερη σπουδαιότητα στην μελέτη μας

εμφανίζονται: το κάπνισμα 41,5% η ανοσοκαταστολή (συμπεριλαμβανόμενη η αντί-TNF αγωγή) 13,7%, το αλκοόλ 10%, ο σακχαρώδης διαβήτης 8,8%, ο καρκίνος 7,4%, η χρήση ουσιών 6,2%. Ακολουθούν με ποσοστό 2,5% οι ασθενείς με HIV, ΧΑΠ, καρδιοπάθεια, νεφροπάθεια και με 1,2% η νόσος του Crohn και ο υποθυρεοειδισμός. Τα κυριότερα συμπτώματα παραμένουν: εμπύρετο, καταβολή, παραγωγικός βήχας, αιμόπτυση, δύσπνοια, απώλεια βάρους και ανορεξία.

Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διακύμανση των θετικών περιπτώσεων ανάλογα με τον μήνα, με αποκορύφωμα τους καλοκαιρινούς μήνες Ιούνιο και Σεπτέμβριο, 15,6% και 12,3% αντίστοιχα (**Πίνακας 11**)

<b>Πίνακας 11. Μηνιαία κατανομή βακτηριολογικά διαγνωσμένες περιπτώσεις TB (2000-2007)</b>		
ΜΗΝΑΣ	Ν°	%
Ιανουάριος	16	8,9%
Φεβρουάριος	9	5%
Μάρτιος	11	6,1%
Απρίλιος	17	9,5%
Μάιος	15	8,4%
<b>Ιούνιος</b>	<b>23</b>	<b>16,2%</b>
Ιούλιος	13	7,3%
Αύγουστος	12	6,7%
Σεπτέμβριος	22	12,3%
Οκτώβριος	8	4,5%
Νοέμβριος	19	10,6%
Δεκέμβριος	8	4,5%

#### **A-4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΚΑΙ ΥΓΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

Από τις 289 θετικές καλλιέργειες 241 (83,3%) ήταν θετικές και στα δύο συστήματα: φιάλες MB/BacT και στο υλικό L-J, 28 (9,7%) μόνο στις φιάλες, 20 (6,9%) μόνο στο L-J. Συνολικά, 260 καλλιέργειες ήταν θετικές στο σύστημα MB/Bact (ευαισθησία 90 %) και 251 στο στερεό υλικό L-J (ευαισθησία 86,8 %). Αναφορικά με το *M. tuberculosis* η ειδικότητα και των δύο συστημάτων ανίχνευσης αντιστοιχούσε σε 100% δεδομένο, ότι σε καμία περίπτωση η κλινική διάγνωση δεν διέφερε από την εργαστηριακή. Ο μέσος χρόνος θετικοποίησης αντιστοιχούσε σε 11,8 ημέρες για το σύστημα MB/BacT AlerT 3D και 22,1 ημέρες για το υλικό L-J με αποτέλεσμα το αυτοματοποιημένο σύστημα να ανιχνεύει το μυκοβακτηρίδιο 10,3 ημέρες νωρίτερα. Το ποσοστό των επιμολύνσεων αντιστοιχούσε σε 11,3% για το σύστημα MB/BacT AlerT 3D και 7,8% για τα σωληνάρια L-J.

#### **A-5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Η ταυτοποίηση έγινε με κλασικές και με μοριακές μεθόδους. Η κλασική ταυτοποίηση (φαινοτυπική), περιλαμβάνει μικροσκοπικούς, καλλιεργητικούς και βιοχημικούς χαρακτήρες. Όλα τα 179 στελέχη ελέχθησαν και βρέθηκαν:

- Z-N (+) θετικά.
- Μη χρωμογόνα, βραδέως αναπτυσσόμενα στους 37°C.
- Παραγωγή νιασίνης: 178 (+), θετικά και 1 (-) αρνητικό.

- Αναγωγή νιτρικών σε νιτρώδη: 178(+), θετικά και 1 (-) αρνητικό.
- Ανάπτυξη σε TCH (Thio-phen-2-carboxylic acid hydroxide): 178 (+), θετικά και 1 (-), αρνητικό.

Η προκαταρκτική ταυτοποίηση έδειξε ότι τα 178 από τα 179 στελέχη είναι *M. tuberculosis* και 1 στέλεχος ήταν αρνητικό στις βιοχημικές δοκιμασίες και τυποποιείται ως *M. bovis*.

Η ταυτοποίηση με μοριακές τεχνικές βελτιώνει σημαντικά το χρόνο εξαγωγής αποτελέσματος. Εφαρμόστηκαν δύο μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης *M. tb.complex* στο καλλιέργημα.

**1. AccuProbe** μέθοδος DNA-RNA υβριδισμού, (**πρτ.8**), τυποποιεί το είδος σε δύο ώρες.

Βρέθηκε θετικό στα 179 στελέχη.

**2. GenoType MTBC** μέθοδος υβριδισμού σε ταινίες νιτροκυτταρίνης (**πρτ.9**). Τα 178 στελέχη τυποποιήθηκαν ως *M. tuberculosis*, ενώ 1 στέλεχος τυποποιήθηκε ως *M. bovis*.

#### **A-6. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΜΕΣΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

Μελετήθηκαν τρία κύρια συστήματα και εκτιμήθηκε η χρησιμότητά τους σε εργαστήριο ρουτίνας όπως είναι το δικό μας, (**πίνακας 12**) Οι τρεις τεχνικές είναι: AMTD, GenoType Direct (MDA), GenoType MTBDR<sub>plus</sub>, και εφαρμόστηκαν σε 147 διαφορετικά δείγματα, όχι μόνο σε Z-N θετικά αλλά και σε Z-N αρνητικά από δείγματα ασθενών με βάσιμη υποψία για TB (**πρωτόκολλα 4, 5, 6**)

. Τα δείγματα που εξετάσθηκαν ήταν πτύελα (94), βρογχικά (31), ούρα (4), γαστρικά υγρά (2), πλευριτικά (3), ιστοί (6), περικαρδικά υγρά (4), εγκεφαλονωτιαίο (1), ασκητικό υγρό (1), κόπρανα (1)

<b>Πίνακας12. Βασικά στοιχεία των μοριακών εμπορικών μεθόδων άμεσης ανίχνευσης <i>M. tb.complex</i> σε κλινικά δείγματα</b>			
	<b>AMTD(GenProbe)</b>	<b>GenoType(MDA) (Hein-Lifescience)</b>	<b>GenoTypeMTBDRPlus (Hein-Lifescience)</b>
<b>Τεχνολογία πολλαπλασιασμού</b>	TMA	NASBA	PCR
<b>Στόχος</b>	rRNA	23SrRNA	23SrRNA, rpoB, inhA, katG
<b>Τρόπος ανίχνευσης</b>	Χημιφωταύγεια	Χρωματομετρική	Χρωματομετρική
<b>Χρόνος εκτέλεσης</b>	3,5 h	5,5h	5h
<b>Αναγκαία μηχανήματα</b>	Sonicator, heat-block,luminometer	Magnetic separator,heat-block,sonicator,thermocycler	Heat- block sonicator,thermocycler
<b>Τιμή</b>	39€	50,5€	56,8€

Από τα 147 δείγματα, τα 50 ήταν θετικά στη χρώση Z-N και στην καλλιέργεια για μυκοβακτηρίδιο, 51 ήταν αρνητικά στη χρώση και θετικά στην καλλιέργεια, και τα υπόλοιπα 46 δείγματα βρέθηκαν αρνητικά στη χρώση και στην καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν μεταξύ τους (**πίνακας 14**). Από τα 101 εξετασμένα δείγματα, θετικά στην καλλιέργεια για μυκοβακτηρίδια (89 αναπνευστικού, 12 έξω-πνευμονικά), αναπτύχθηκαν 96 MTBC, 4 *M. Avium*, 1 *M. Intracellulare*). Τρία από τα θετικά δείγματα με MTBC βρέθηκαν διπλά με άτυπα μυκοβακτηρίδια (2 δείγματα με *M. intracellulare*, 1 δείγμα με *M. avium*), 4 θετικά δείγματα με το *M. avium* και 1 δείγμα με το *M. intracellulare* (**πίνακας 13**)

<b>Πίνακας 13 Αποτελέσματα ταυτοποίησης 101 Μυκοβακτηριδίων στα εξετασμένα κλινικά δείγματα.</b>										
Type of Mycobacterium	Z-N (+)		Καλλιέργεια (+)		AMTD (+)		GT Direct +		GT Plus(+)	
	ΠIN	Έξω ΠIN	ΠIN	Έξω ΠIN	ΠIN	Έξω ΠIN	ΠIN	Έξω ΠIN	ΠIN	Έξω ΠIN
MTBC	46	1	89	11	77	9	78	9	84	10
MTBC+M.avium	1						1			
MTBC+M.intracel.							2			
M.avium		1		1			3	1		
M.intracellulare	1						1			
Σύνολο Av/Μη-Av	48	2	89	12	77	9	85	10	84	10
Σύν. ανά δοκιμή	50		101		86		95		94	

ΠIN.= δείγματα αναπνευστικού, Έξω-ΠIN= Μη-αναπνευστικά δείγματα.

Με βάση τα αποτελέσματα των καλλιιεργειών, έγινε ανάλυση της οξεάντοχης χρώσης Z-N σε σχέση με τα αποτελέσματα των μοριακών δοκιμασιών και το είδος των δειγμάτων. Ο **πίνακας 14** παρουσιάζει τη συγκριτική μελέτη σε σχέση με τα αναπνευστικά δείγματα, η ευαισθησία για τις δοκιμασίες AMTD, Direct, MTBDRPlus ήταν 88,1%, 95,6% και 94,6% αντίστοιχα. Σε σχέση με τα εξωπνευμονικά δείγματα, η ευαισθησία βρέθηκε για τις δοκιμασίες AMTD, Direct, MTBDRPlus: 84%, 91,6%, και 91,6% αντίστοιχα. Αναλυτικά, από τα 125 αναπνευστικά δείγματα, 89 βρέθηκαν με θετική καλλιέργεια ( 48 Z-N θετικά και 41 Z-N αρνητικά). Με θετική δοκιμασία AMTD, βρέθηκαν 77 με θετική καλλιέργεια δείγματα (44 Z-N θετικά και 33 Z-N αρνητικά). Με θετική δοκιμασία GenoType Direct, βρέθηκαν 85 με θετική καλλιέργεια δείγματα (δύο μεικτές καλλιέργειες MTBC και *M. intracellulare*, μία μεικτή καλλιέργεια MTBC και *M. avium*, 3 μονοκαλλιέργειες με *M. avium* και μία με *M. intracellulare*), από τα οποία τα 49

Z-N θετικά (μία μικτή καλλιέργεια MTBC και *M. Avium*, ένα δείγμα με *M. avium* και ένα με *M. intracellulare*) και 39 Z-N αρνητικά. Σε σχέση με τα 22 εξετασμένα εξωπνευμονικά δείγματα, τα 12 ήταν με θετική καλλιέργεια (2 Z-N θετικά και 10 Z-N αρνητικά). Από τα 12 θετικής καλλιέργειας εξωπνευμονικά δείγματα, βρέθηκαν: 9 θετικά με τη μέθοδο AMTD (1 Z-N θετικό και 8 Z-N αρνητικά), 10 θετικά με τη μέθοδο GT Direct, στο ένα δείγμα ανιχνεύθηκε *M. avium*, (2 Z-N θετικά και 8 Z-N αρνητικά), και με τη μέθοδο MTBDRPlus 10 θετικά δείγματα (1 Z-N θετικό και 9 Z-N αρνητικά).

Πίνακας 14. Συγκριτική ανάλυση των θετικών και αρνητικών οξείαντοχης χρώσης δειγμάτων, σε σχέση με την προέλευσή τους και των αποτελεσμάτων των μοριακών τεχνικών.								
Δείγματα N=147	Δείγματα με θετική καλλιέργεια N=101					Ευαισθησία %		
	AMTD	Direct	Plus	ZN(+)	ZN(-)	MTD	Direct	Plus
Αναπνευστικού N=125, pos=89	77	85*	84	48	41	88,1%	95,6%	94,6%
Εξωπνευμονική N=22, pos=12	9	10**	10	2	10	84,6%	91,6%	91,6%
Σύνολο	86	95	94	50	51	87%	94,3%	93,5%
ZN(+) N=50	45	49¶	48			90,9%	98%	96,1%
ZN(-) N=51	41	47¶¶	46			83,6%	92,7%	89,4%

\*2 διπλά στελέχη (MTBC+*M. intracellulare*), 1 ένα MTBC+*M. avium*, 3 τρία *M. avium* strains, 1 ένα *M. intracellulare* strain

\*\*1 στέλεχος *M. avium*

¶1 διπλό στέλεχος (MTBC+*M. avium*), 1 ένα *M. avium* strain, 1 ένα *M. intracellulare* strain

¶¶2 διπλά στελέχη (MTBC+*M. intracellulare*), 3 τρία *M. avium* strains

## A-7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

### *M.TUBERCULOSIS*

- **Με τη μέθοδο των αναλογιών (πρωτόκολλα 10 και 11)**

Έγινε μελέτη των αντοχών που εμφάνισαν τα στελέχη *M. tuberculosis* όπως προσδιορίστηκαν στο εργαστήριο, ως προς τα σημαντικότερα αντιφυματικά φάρμακα (ΑΦ), INH, RMP, EMB, SM, PZA, και PAS. Οι αντοχές των 179 στελεχών *M.tuberculosis* από διαφορετικούς ασθενείς, τα οποία απομονώθηκαν σε μια περίοδο οκτώ ετών (2000-2007), προσδιορίστηκαν αρχικά με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος MB/BacT/Alert 3D, (πρτ.10) και στη συνέχεια με τη μέθοδο αναλογιών Χρησιμοποιήθηκε υλικό Löwenstein-Jensen με ενσωματωμένο το αντίστοιχο αντιβιοτικό (Bio Merieux, Marcy l'Etoile, France), (πρτ.11).

**Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιφυματικά φάρμακα έδειξε ότι 146/179 (81,6%) των στελεχών *M.tuberculosis* ήταν ευαίσθητα σε όλα αντι-φυματικά φάρμακα, ενώ 33/179 (18,4%) ήταν ανθεκτικά σε ένα ή περισσότερα φάρμακα. Μεταξύ των 33 ανθεκτικών στελεχών παρατηρήθηκαν 14 διαφορετικοί φαινότυποι αντοχής (πίνακας 15).**

Όπως διαφαίνεται, στο υψηλότερο επίπεδο μονοαντοχή σημειώθηκε στη στρεπτομυκίνη σε 10 περιπτώσεις (5,6%), ακολουθεί η μονοαντοχή στη ισονιασίδα σε 6 περιπτώσεις (3,9%), στην εθαμβουτόλη σε 5 περιπτώσεις (2,8%), συνδυασμένη αντοχή σε δύο



φάρμακα σε 5 περιπτώσεις (2,8%), συνδυασμένη αντοχή σε τρία φάρμακα σε 6 περιπτώσεις (3,9%). Πολυαντοχή (MDR-resistance), σημειώθηκε σε 1 μόνο στέλεχος (0,5%) όλων των στελεχών, το οποίο παρουσίασε αντοχή και στη κινολόνη, ριφαπεντίνη και εθιωναμίδη.

Η μελέτη των φαινοτύπων αντοχής, ξεχωριστά στους Έλληνες και μετανάστες είναι 19/132 vs. 14/47. καταδεικνύει αρκετά μεγαλύτερη αναλογία αριθμό φαινοτύπων εις βάρος των μεταναστών, καθώς και το μοναδικό πολυανθεκτικό στέλεχος MDR ανήκε σε μετανάστη από τη Ρουμανία.

**Πίνακας 15 Φαινότυποι αντοχών των 33 ανθεκτικών στελεχών *M.tuberculosis*, που απομονώθηκαν από τους 179 ασθενείς κατά της διάρκειας 2000-2007.**

Αντιφυματικά φάρμακα										Στελέχη (Ελλ/μετ.)	
SM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	(7/3)
—	INH	—	—	—	—	—	—	—	—	6	(3/3)
—	—	—	EMB	—	—	—	—	—	—	5	(5/0)
SM	INH	—	—	—	—	—	—	—	—	1	(0/1)
SM	—	—	EMB	—	—	—	—	—	—	1	(0/1)
—	INH	—	EMB	—	—	—	—	—	—	1	(1/0)
—	INH	—	—	—	PAS	—	—	—	—	1	(0/1)
—	—	—	EMB	—	PAS	—	—	—	—	1	(0/1)
SM	INH	—	EMB	—	—	—	—	—	—	1	(1/0)
SM	INH	—	—	PZA	—	—	—	—	—	1	(0/1)
SM	INH	—	—	—	PAS	—	—	—	—	1	(0/1)
SM	—	—	EMB	PZA	—	—	—	—	—	1	(0/1)
—	INH	—	EMB	PZA	—	—	—	—	—	2	(2/0)
SM	INH	RMP	EMB	PZA	—	PFL	RFP	ETH	—	1	(0/1)

SM=streptomycin, INH=isoniazid, EMB=ethambutol, RMP=rifampicin, PZA=pyrazinamide, PFL=pefloxacin, RFP=rifapentin, ETH=ethionamide, Ελ=Έλληνες, μετ=μετανάστες.

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα στα πρώτης γραμμής αντιφυματικά φάρμακα Ισονιαζίδη (INH), Ριφαμπικίνη (RMP), Στρεπτομυκίνη (SM), Εθαμβουτόλη (EMB), Πυραζιναμίδη (PZA), Πάρα-αμίνο-σαλκυλικό οξύ (PAS), καθώς και τη πολυανθεκτικότητα (MDR) και την πολυαντοχή (αντοχή σε δύο και περισσότερα αντιφυματικά φάρμακα), ο αριθμός των ανθεκτικών M.TB στελεχών, από τα οποία προέκυψαν τα ποσοστά ανθεκτικότητας (%), αντίστοιχα ήταν:

**1. α' περίοδος (104 M.TB. στελέχη)**

INH 3 (2,9%), RMP 1(0,96%), EMB 5(4,8%), SM 7 (6,7%), PZA 1(0,96%), PAS 2(1,9%), MDR 1(0,96%), Πολυαντοχή 4(3,8%) **(πίνακας 16)**

**2. β' περίοδος (75 M.TB στελέχη)**

INH 12 (16%), RMP 0 (0%), EMB 8 (10,7%), SM 9 (12%), PYR 4 (5,3%), PAS 1 (1,3%), MDR 0 (0%), Πολυαντοχή 9 (12%) **(πίνακας 16)**

**Συνεπώς, η ανθεκτικότητα στο σύνολο των 179 ασθενών της μελέτης και στο σύνολο της περιόδου 2000-2007, με βάση των απομονωθέντων στελεχών ήταν: INH 15 (8,4%), RMP 1 (0,56%), EMB 13 (7,3%), SM 17 (9,5%), PZA 5 (2,8%), PAS 3 (1,7%), MDR 1 (0,56%), Πολυαντοχή 12 (6,7%) (πίνακας 16)**

<b>Πίνακας 16. Συγκριτικά αποτελέσματα αντοχών κατά τη μελέτη των δύο περιόδων και συνολικά</b>									
<b>. ETH</b>	<b>Ασθενείς (%)</b>	<b>INH</b>	<b>RMP</b>	<b>EMB</b>	<b>SM</b>	<b>PYR</b>	<b>PAS</b>	<b>MDR</b>	<b>Πολύ- αντοχή</b>
2000- 2003	104 100%	3 2,9%	1 0,96%	5 4,8%	8 7,7%	1 0,96%	2 1,9%	1 0,96%	3 2,9%
2004- 2005	75 100%	12 16%	0 0%	8 10,7%	9 12%	4 5,3%	1 1,3%	0 0%	9 12%
<b>2000- 2007</b>	<b>179 100%</b>	<b>15 8,4%</b>	<b>1 0,56%</b>	<b>13 7,3%</b>	<b>17 9,5%</b>	<b>5 2,8%</b>	<b>3 1,7%</b>	<b>1 0,56%</b>	<b>12 6,7%</b>

Η ανθεκτικότητα ξεχωριστά στους επιμέρους πληθυσμούς, των Ελλήνων και των μεταναστών, αναφορικά με τα δύο κυριότερα αντιφυματικά φάρμακα, την INH και Ριφαμπικίνη, καθώς και την πολυανθεκτικότητα ήταν: Για μεν τους Έλληνες 7 (5,3%), 0 (0%) και 0 (0%), για δε τους μετανάστες 8 (17%), 1 (2,1%) και 1 (2,1%), αντίστοιχα (πίνακας17)

<b>Πίνακας 17. Ανθεκτικότητα στα κύρια πρωτεύοντα αντιφυματικά INH και RMP, καθώς και πολυανθεκτικότητα στελεχών <i>M. tb.</i> χωριστά στους Έλληνες και στους μετανάστες.</b>				
Ομάδες πληθυσμού	Ασθενείς (%)	Αντοχή στη INH (%)	Αντοχή στη RMP (%)	MDR (%)
Έλληνες	132 (100)	7 (5,3)	0	0
Μετανάστες	47 (100)	8 (17)	1 (2,1)	1 (2,1)

- **Μοριακή τεχνική ελέγχου αντοχής στα πρωτεύοντα αντιφυματικά φάρμακα INH και RMP (GenoType MTBDRPlus, πρωτ.6)**

Η τεχνική εφαρμόστηκε σε όλα τα 179 στελέχη *M. tuberculosis*, αποκαλύφθηκαν 15 στελέχη με γονότυπους αντοχής στην INH και 1 στέλεχος στη RMP, με τα ακόλουθα αποτελέσματα των υποκείμενων μηχανισμών αντοχής:

- I. Ως προς την INH αποκαλύφθηκαν δύο διαφορετικοί γονότυποι:

α ) μετάλλαξη στο κωδικόνιο 315 του γονίδιο katG (Ser→Thr): 9/15,(6 Έλληνες και 3 μετανάστες).

β ) μετάλλαξη στην εναρκτήρια περιοχή inhA (C-T): 6/15, (1 Έλληνας και 5 μετανάστες).

γ ) καμία μετάλλαξη δεν εμφανίστηκε σε ένα ανθεκτικό στην INH στέλεχος με τη μέθοδο αναλογιών: 1/15 (ένας Βούλγαρος)

δ ) μετάλλαξη στο γονίδιο katG (Ser-Thr) σε ευαίσθητο στην INH στέλεχος: (ένας Έλληνας).

II. Ως προς την αντοχή στη RMP, αποκαλύφθηκε ένα INH-ανθεκτικό στέλεχος (katG, 315), να έχει μετάλλαξη στο κωδικόνιο 516 (Asp→Val) του rpoB γονίδιο (ένας Ρουμάνος).

Η δοκιμασία ανίχνευσης γόνου αντοχής στα αντιφυματικά φάρμακα GenoType MTBDR*Plus* ανίχνευσε σωστά 14 από τα 15 ανθεκτικά στην INH στελέχη, τα οποία η ευαισθησία τους είχε ελεγχθεί με τη κλασική μέθοδο αναλογιών: ευαισθησία 93,3% (14/15) και ειδικότητα 99,3%. Η ευαισθησία της μεθόδου για την ανίχνευση αντοχής στη RMP, σε σύγκριση με τη μέθοδο αναλογιών ήταν 100% (1/1) και ειδικότητα 100%.

- **Μοριακή τεχνική ελέγχου αντοχής στα δευτερεύοντα αντιφυματικά φάρμακα όπως φλουοροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες και EMB (GenoType MTBDR*sl*, πρτ.6)**

Η τεχνική εφαρμόστηκε σε όλα τα στελέχη *M. tuberculosis* και αποκαλύφθηκε μόνο το πολυανθεκτικό στέλεχος με γονότυπο αντοχής στην EMB.

- I. Ως προς την αντοχή στις φλουροκινολόνες, κανένα στέλεχος, είτε ευαίσθητο, είτε ανθεκτικό σε πρωτεύοντα αντιφυματικά φάρμακα, δεν εμφάνισε μετάλλαξη στο γονίδιο *gyrA*.
- II. Ως προς την αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, επίσης κανένα στέλεχος *M. tuberculosis* δεν εμφάνισε μετάλλαξη στο γονίδιο *rrs*.
- III. Ως προς την αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, επίσης κανένα στέλεχος *M. tuberculosis* δεν εμφάνισε μετάλλαξη στο γονίδιο *rrs*.

Η δοκιμασία ανίχνευσης γόνου αντοχής στα αντιφυματικά φάρμακα GenoType MTBDs/ ανίχνευσε σωστά ένα από τα 13 ανθεκτικά στην EMB στελέχη, τα οποία η ευαισθησία τους προσδιορίστηκε με την κλασική μέθοδο αναλογιών σε LJ στερεό υλικό με κριτικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου 2 και 3 µg/ml και με την τροποποιημένη κλασική μέθοδος σε υγρό υλικό MB/BacT Alert 3D (κριτική συγκέντρωση EMB: 5 µg/ml). (Πίνακας 18). Τέσσερα από τα πέντε στελέχη με αντοχή στην EMB (5µg/ml), εμφάνισαν μεταλλάξεις στους γόνους αντοχής *katG* (Ser-Thr). Η ευαισθησία της μεθόδου για τη γεωγραφική περιοχή της Κρήτης είναι χαμηλή (1/13 για όλα τα ανθεκτικά στελέχη στην EMB και 1/5 για τα στελέχη με ανθεκτικότητα στην EMB σε κριτική συγκέντρωση των 5 µg/ml).

**Πίνακας 18. Κριτικές συγκεντρώσεις της EMB (13 στελέχη) με τις κλασικές δοκιμασίες σε σχέση με τα αποτελέσματα της μοριακή μεθόδου MTBDRIs.**

Εξεταζόμενο γονίδιο αντοχής	Κλασική μέθοδος αναλογιών για EMB		MB/BacT μέθοδος 5µg/ml αρ.=5
	2µg/ml αρ.=8	3µg/ml αρ.=2	
<i>embB</i>	0	0	1

### **3.B. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΠΟ ΑΤΥΠΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ 2000-2007 ΣΤΟ ΠΑΓΝΗ**

B-1. Κατανομή των δειγμάτων, στα οποία απομονώθηκαν άτυπα μυκοβακτηρίδια.

B-2. Διερεύνηση της ποικιλότητας των ειδών μυκοβακτηριδίων που απομονώθηκαν στο ΠΑΓΝΗ.

B-3. Δοκιμασίες ευαισθησίας στα αντιμυκοβακτηριακά φάρμακα.

Από τις 187 θετικές για άτυπα μυκοβακτηρίδια καλλιέργειες που αντιστοιχούν σε 141 ασθενείς, απομονώθηκαν και τυποποιήθηκαν 19 είδη. Από τα στελέχη αυτά, τα 51 βρέθηκαν Ταχέως αναπτυσσόμενα (26 *M. fortuitum*, 9 *M. peregrinum*, 7 *M. chelonae*, 5 *M. abscessus*, 1 *M. thermoresistibile*, 2 *M. mucogenicum*, 1 *M. europaeum*) και τα 90 Βραδέως αναπτυσσόμενα ( 24 *M. avium*, 4 *M. intracellulare*, 1 *M. scrofulaceum*, 4 *M. kansasii*, 1 *M. marinum*, 1 *M. malmonse*, 1 *M. xenopi*, 10 *M. lentiflavum*, 29 *M. gordonae*, 2 *M. arupense*, 12 *M. GN01*, 1 *M. GN-9680*). (1,46,65,90,108,139,191) Σχετιζόμενα με τη νόσο, σύμφωνα με τα κριτήρια της Αμερικάνικης Θωρακικής Εταιρίας βρέθηκαν 40 άτυπα μυκοβακτηρίδια.

Πίνακας 19. Ανάλυση των αποτελεσμάτων των καλλιεργειών από άτυπα μυκοβακτηρίδια (ΜΦΜ) κατά την περίοδο 2000-2007.

Είδος Μη-φυματιώδη Μυκοβακτηρίδια	Συνολικός αριθμός	Στελέχη σχετικά με λοίμωξη	ZN (+)	Έλληνες	Αλλοδαποί	Εντόπιση Πνευμ.	Εντόπιση Εξωπν.
<i>Gordonae</i>	29	1	1	1		1	
<i>Fortuitum</i>	26	4	2	3	1	4	
<i>Avium</i>	24	20	8	14	6	6	14
<i>Herakleum</i>	12	0	0				
<i>Lentiflavum</i>	10	0	0				
<i>Peregrinum</i>	9	0	0				
<i>Chelonae</i>	7	2	1	2		2	
<i>Abscessus</i>	5	2	0	1	1	2	
<i>Intracellulare</i>	4	4	2	4		1	3
<i>Kansasii</i>	4	4	2	3	1	4	
<i>Mucogenicum</i>	2	0	0				
<i>Arupense</i>	2	0	0				
<i>Thermoresistibile</i>	1	0	0				
<i>Europaeum</i>	1	0	0				
<i>Scrofulaceum</i>	1	1	1	1			1
<i>Marinum</i>	1	1	0	1			1
<i>Malmonse</i>	1	0	0				
<i>Xenopi</i>	1	1	0	1	1		
<i>GN 9680</i>	1	0	0				
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	141	40	17	31	9	21	19

Από την ανάλυση όλων των θετικών καλλιιεργειών για άτυπα μυκοβακτηρίδια (**πίνακας 19**), που αντιστοιχούν σε ισάριθμους ασθενείς, μόνο το 28,2% (40/141) πληρεί τις προϋποθέσεις για να στοιχειοθετηθεί λοίμωξη. Στο άμεσο παρασκεύασμα με χρώση Z-N 17 δείγματα από τα 40 που αντιστοιχούν σε λοίμωξη (42,5 %), βρέθηκαν θετικά. Από τα 17 Z-N (+) δείγματα, τα 9 (52,9%) ήταν λεμφαδένες, τα 5 (29,4%) ήταν πτύελα, τα 2 (11,8%) κόπρανα και ένα (5,9%) αίμα. Από τα 40 δείγματα ασθενών με μυκοβακτηριδίωση τα 31 (77,5%) ανήκαν σε έλληνες και τα 9 (22,5%) σε αλλοδαπούς ( 4 Αλβανοί, ένας Άγγλος, ένας Γερμανός, μία Βουλγάρα, μία Ρωσίδα, και μία Σέρβα). Πνευμονική εντόπιση είχαν 21 (52,5%) δείγματα και εξωπνευμονική 19 (47,5%) δείγματα. Τα εξωπνευμονικά δείγματα συμπεριελάμβαναν 13 λεμφαδένες, 3 αίμα, 2 κόπρανα, 1 δέρμα. Στον **πίνακα 20** διαφαίνεται ο διαχωρισμός το κάθε άτυπο μυκοβακτηρίδιο με βάση της εντόπισης της νόσου. Το πιο παθογόνο άτυπο μυκοβακτηρίδιο βρέθηκε το *M. avium* με 20 περιπτώσεις, 50% (20/40) όλων των λοιμώξεων από άτυπα. Ακλουθούν με ποσοστά 10% το *M. kansasii* και *M. fortuitum*.



**Πίνακας 20. Νόσηση από άτυπα Μυκοβακτηρίδια.  
Κατανομή κατά εντόπιση και είδος**

	M.avium-complex				M.fortuitum-chelonae complex						
Εντόπιση	Avium	Intracellulare	Scrofulaceum	Kansasii	Fortuitum	Chelonae	Abscessus	Xenopori	Gordona	Marinum	Σύνολο
πνευμ	6	1		4	4	2	2	1	1		21
λεμφ	9	3	1								13
αίμα	3										3
κόπρ	2										2
δέρμα										1	1
σύνολο	20	4	1	4	4	2	2	1	1	1	40

Από τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών (πίνακας 21), ο λόγος της αναλογίας ανδρών/γυναικών βρέθηκε 0,82 (18/22), η νεότερη ηλικία ασθενών 17,2 ετών αφορά δείγματα από λεμφαδένα. Μεγαλύτερη σε ηλικία βρέθηκαν οι ασθενείς με πνευμονική εντόπιση (53,1 ετών). Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών με μυκοβακτηριδίωση διαμορφώθηκε στα 40,3 έτη.

**Πίνακας 21. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 40 ασθενών με νόσηση από άτυπα μυκοβακτηρίδια.**

Χαρακτηριστικά	Πνευμονική νόσος: αρ. (21)	Λεμφαδενίτιδα: αρ. (13)	Διάσπαρτη νόσος: αρ. (5)	Δερματική νόσος: αρ. (1)
<b>Ηλικία</b>	53,1 ετών	17,2 ετών	45,6 ετών	43 ετών
<b>Φύλο:</b>				
<i>Ανδρες (18)</i>	9	5	4	
<i>Γυναίκες: (22)</i>	12	8	1	1
<b>Υποκείμενη νόσος:</b>				
<i>Προϋπάρχουσα πνευμονική:</i>				
TB	3			
Βρογχιεκτασίες	3			
ΧΑΠ	5			
<i>Κακοήθεια</i>	1 (Ca πνευμ.)		1 (λευχαιμία)	
<i>HIV</i>			4	
<i>Αυτοάνοση νόσος</i>	4 (ρευματ. αρθρίτης)			
<i>Κάπνισμα</i>	7			

### 3. Γ. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ:

Για τους ασθενείς με λοίμωξη από *M. avium*, υπήρξαν οι σοβαρότεροι παράγοντες κινδύνου όπως κάπνισμα, ΧΑΠ, HIV, ρευματοειδή αρθρίτιδα, βρογχιεκτασίες, λευχαιμία τριχωτών κυττάρων και Ca πνεύμονα. Για τους ασθενείς με *M. kansasii* φαίνεται ότι ρόλο έπαιξαν το κάπνισμα, ΧΑΠ, ηωσινοφιλική πνευμονοπάθεια και η θετική Mantoux. Στα ταχέως αναπτυσσόμενα, παράγοντες κίνδυνου εμφανίζονται η ΧΑΠ, κάπνισμα, ρευματοειδή αρθρίτιδα, παλαιά TB, Ca πνεύμονα, υποθυρεοειδισμός. Ο μοναδικός ασθενής με λοίμωξη από *M. gordonae*, έπασχε από ρευματοειδή αρθρίτιδα και βρισκόταν υπό θεραπεία με μετοτρεξάτη.

Για τους ασθενείς με λοίμωξη από *M. xenopi*, *M. marinum* και *M. scrofulaceum* δεν αναφέρθηκε παράγοντας κίνδυνου (πίνακας 21).

### 3. Δ. ΣΠΑΝΙΑ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΥΡΓΙΑ ΕΙΔΗ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΟΥ ΠΑΓΝΗ

#### Ταχέως αναπτυσσόμενα:

**Δ-1. *M. thermoresistible*:** απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία από το Tsukamura το 1966. Η ονομασία του είδος δείχνει την ικανότητα του να αναπτύσσεται στους 52°C. Σχετίζεται σοβαρά με λοιμώξεις στον άνθρωπο αλλά μόνο έξι αναφορές έχουν γίνει στη διεθνή βιβλιογραφία. έως σήμερα.

67-χρονος ασθενής, Έλληνας, με αποφρακτική πνευμονοπάθεια, αναπνευστική ανεπάρκεια δευτέρου βαθμού, διαβήτη και υψηλό πυρετό (38°C) προσήλθε στο νοσοκομείο μας παρουσίασε επίσης παραγωγικό βήχα, δύσπνοια και οξεία πορφύρα. Η

εξέταση Mantoux βγήκε θετική (30 mm). Η ακτινογραφία θώρακος παρουσίασε ευρήματα χρόνιας πνευμονοπάθειας, περιβρογχικές διηθήσεις και διηθήσεις στο δεξί μέσο και κάτω πνευμονικό πεδίο. Από ένα δείγμα πτυέλων του ασθενούς, απομονώθηκε το *M. thermoresistibile*. Αυτή είναι η έβδομη αναφορά του *M. thermoresistibile* παγκοσμίως και πρώτη στην Ευρώπη. Το βιοχημικό του προφίλ συμπεριλαμβάνει αρνητικές τις δοκιμασίες αναγωγή νιτρικών, αναγωγή σιδήρου, αρυλσουλφατάσης και β-γαλακτοσιδάση. Καμία ανάπτυξη δεν παρατηρήθηκε στους 20°C, αντιθέτως αναπτύχθηκε στους 37°C και 45°C. Θετική ήταν η παραγωγή καταλάσης στους 68°C, όπως και  $\square 45$  mm μετρήθηκε ο αφρός από τη θετική καταλάση. Καμία ανάπτυξη δεν παρατηρήθηκε στο υλικό McConkey ενώ θετική ήταν η καλλιέργεια σε υλικό L-J με ενσωματωμένο το thiophene-2-carboxylic hydrazide. Έγινε στη συνέχεια έλεγχος με το σύστημα GenoType CM (1,2,3, και 10) και GenoType AS με προφίλ μπαντών (1,2, 3 και 12) αντίστοιχα χωρίς να προσδιοριστεί είδος, εξαιρέθηκε όμως το *M. phlei*. Η ταυτοποίηση τελικά πραγματοποιήθηκε με προσδιορισμό της αλληλουχίας των γονιδίων 16S rRNA και hsp65 (**πρτ. 14**). Προϊόν με 1869 ζεύγη βάσεων, το οποίο περιέχει όλο το μέγεθος του γόνου 16S rRNA και 16S–23S αντίγραφο εσωτερικής περιοχής (ITS) πολλαπλασιάστηκε σε αυτόματο μηχάνημα προσδιορισμού αλληλουχιών (3730 DNA analyzer; Applied Biosystem Inc, Foster City, CA, USA), χρησιμοποιώντας το κιτ Big Dye terminator sequencing kit (Applied Biosystems) με τους εναρκτές F16S, R16S και ITS2. Επιπλέον, πολλαπλασιάστηκε τεμάχιο των 439 ζευγών βάσεως της πρωτεΐνης 65-kDa heat shock (*hsp65*), χρησιμοποιώντας τους εναρκτές Tb11 and TB12.

Οι αλληλουχίες των 16S rRNA και *hsp65* κατατέθηκαν στη GenBank (60) με αύξοντα αριθμούς **FJ236481** και **FJ236482** αντίστοιχα.

Η αλληλουχία του 16S rRNA συγκρίθηκε με τις αλληλουχίες των καταθέσεων του Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms ([www.ridom.de](http://www.ridom.de)) και της GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) με ομοιότητα 100% (429/429 ταύτιση) με την αλληλουχία του γονίδιο 16S rRNA του *M. thermoresistibile* DSM 44167 και 99% ομοιότητα (1398/1409 ταύτιση) με την αλληλουχία του γονιδίου the 16S rRNA του στελέχους *M. thermoresistibile* ATCC 19527 (X55602). Η σύγκριση με άλλες δημοσιευμένες αλληλουχίες στη GenBank έδειξε 99% ομοιότητα (438/439) με την αλληλουχία του *hsp65* του στελέχους *M. thermoresistibile* CIP105390(AF547880) και 99% ομοιότητα (437/439) με το στέλεχος *M. thermoresistibile* ATCC 19527(AY299162). Στη συνέχεια, εκτελέστηκε η μεθοδολογία PCR-RLFP στο πολλαπλασιασμένο προϊόν του γονιδίου *hsp65* (**πρτ. 15**), με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *HaeIII* (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA, UK) και *BstEII* (New England Biolabs). Το μίγμα τοποθετήθηκε σε τζελ αгарόζης 3.5% metaphor (Cambrex Bioscience). Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *BstEII* παρουσίασε δύο τεμάχια των 235 και 210 ζεύγη βάσεων, ενώ με το περιοριστικό ένζυμο *HaeIII* παρουσιάστηκαν τέσσερα τεμάχια των 180, 135, 70, και 50 ζεύγη βάσεων (εικ.5).



Εικόνα 8:

Ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης των τμημάτων που παρήχθησαν από την πέψη των πολλαπλασιασμένων με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) προϊόντων του γονιδίου *hsp65* με το περιοριστικό ένζυμο *BstEII* (γραμμή Β) και *Hae III* (γραμμή Η), γραμμή L: κλίμακα των 50 ζεύγη βάσεων (bp), (Fermentas)

Ο έλεγχος ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του E-τεστ. (12,54,98,179)

Τα αποτελέσματα έδειξαν ευαισθησία στα αντιβιοτικά: αμικασίνη (0.064  $\mu$ g/ml), κεφοξιτίνη (1.0  $\mu$ g/ml), οφλοξασίνη (0.032  $\mu$ g/ml), σιπροφλοξασίνη (0.032  $\mu$ g/ml), λεβοφλοξασίνη (0.016  $\mu$ g/ml), κλαρυθρομυσίνη (0.023  $\mu$ g/ml), δοξυκυκλίνη (0.064  $\mu$ g/ml), ιμιπενέμ (0.064  $\mu$ g/ml), και θριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη (0.064  $\mu$ g/ml) και ανθεκτικότητα στην εθιναμίδη (256.0  $\mu$ g/ml)

**$\Delta$ -2. *M. europaeum* (M.GN-10643):** οξεάντοχος κοκκοβάκυλος, απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα από πτύελα ασθενούς και μαζί με άλλα δύο στελέχη διεθνώς διαμορφώνουν καινούργιο στέλεχος.

Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με προσδιορισμό της αλληλουχίας των γονιδίων 16S rRNA και hsp65 (**πρτ. 14**). Οι αλληλουχίες των 16S rRNA και hsp65 κατατέθηκαν στη GenBank αύξοντα αριθμό **1155885** και **1155883** αντίστοιχα.

Έγινε σύγκριση των αλληλουχιών με άλλες δημοσιευμένες αλληλουχίες στη GenBank, έδειξε ομοιότητα με το στέλεχος M.MCRO 17 και στενή ομοιότητα με το M.elephantis. Το βιοχημικό του προφίλ παρουσίασε χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του M.flavescens (παραγωγή ανοιχτοκίτρινης χρωστικής, ανάπτυξη στους 37, 22 και στους 44 σε < από 7 ημέρες, καμία ανάπτυξη στο υλικό McConkey χωρίς κρυστάλ-βιολέ, νιασίνη (-), αναγωγή νιτρικών (+), αρυλσουλφατάση 3ημ.(-), ουρεάση (+), β-γλουκοσιδάση (+), ημιποσοτική καταλάση (+), υδρόλυση Tween 80 (+)), με την μοριακή τεχνική Genotype CM παρουσιάστηκαν μπάντες στα σημεία 1,2,3 και 10, χωρίς την δυνατότητα ταυτοποίησης. Ο έλεγχος ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του E-test με τις ακόλουθες ευαισθησίες: αμικασίνη (0,19 μ g/ml), εθοναμίδη (0,125 μ g/ml), κλαρυθρομυσίνη (0,75 μ g/ml), ροξυθρομυκίνη (1,5 μ g/ml), αζυθρομυκίνη (128 μ g/ml), δοξυκυκλίνη (2,0 μ g/ml), και ανθεκτικότητας: τομπραμυκίνη (64,0 μ g/ml), ιμιπενέμι (□32 μ g/ml), κεφοξιτίνη (32 μ g/ml), λεβοφλόξασιν (16 μ g/ml) θριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη (32 μ g/ml), λινεζολίδη (48 μ g/ml), ριφαμπικίνη (12 μ g/ml), αουγμεντιν/κλαβουλανικό οξύ (□256 μ g/ml), και τιγκεκυκλίνη (128 μ g/ml).

**Δ-3. M. GN-11124 (M.cretae):** απομονώθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριό μας, από μοναδικό δείγμα πτυέλων συγγενή ασθενούς με λοίμωξη αναπνευστικού και για το λόγο αυτό προτάθηκε η ονομασία *Mycobacterium cretae*. Το στέλεχος ήταν ταχέως αναπτυσσόμενο, χρωμογόνο, (παρήγαγε πορτοκαλόχρωα χρωστική), ανάπτυξη- καλύτερη

στους 37°C, καμία ανάπτυξη στο υλικό McConkey χωρίς κρυστάλ-βιολέ. Με τη μοριακή τεχνική Genotype CM και AS, η ταυτοποίηση ήταν αδύνατη (παρουσίαση μπαντών 1,2,3 και στις δύο τεχνικές). Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του 16Sr RNA γονιδίου έδειξε ομοιότητες 98% με το *M.brasilense*, ενώ ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδίου στόχου heat-shock 65 kD (*hsp65*) παρουσίασε ομοιότητα με το *M. flavescens* και *M.phlei*. Κατατέθηκε ως καινούργιο στέλεχος στη GenBank με αύξοντες αριθμούς: FJ652846 για την αλληλουχία του 16Sr RNA γονιδίου και :FJ652847 για την αλληλουχία του γονιδίου στόχου heat-shock 65 kD (*hsp65*). Το βιοχημικό του προφίλ παρουσίασε χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του *M.flavescens* (παραγωγή ανοιχτοκίτρινης χρωστικής, ανάπτυξη στους 37, 22 και στους 44 σε < από 7 ημέρες, καμία ανάπτυξη στο υλικό McConkey χωρίς κρυστάλ-βιολέ, νιασίνη (-), αναγωγή νιτρικών (+), αρυλσουλφατάση 3ημ.(-), ουρεάση (+), β-γλουκοσιδάση (+), ημιποσοτική καταλάση (-), υδρόλυση Tween 80 (+)), με την μοριακή τεχνική Genotype CM και AS παρουσιάστηκαν μπάντες στα σημεία 1,2,3, χωρίς την δυνατότητα ταυτοποίησης. Ο έλεγχος ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του E-test με τις ακόλουθες ευαισθησίες: αμικασίνη (0,19 μ g/ml), κλαρυθρομυσίνη (0.19 μ g/ml), ροξυθρομυκίνη (0,025 μ g/ml), αζυθρομυκίνη (1,0 μ g/ml), δοξυκυκλίνη (0,047 μ g/ml), ισονιαζίδη (1.0 μ g/ml), δαψομυκίνη (1,0 μ g/ml), λέβοφλοξασίνη (0,25 μ g/ml), σπαρφλοξασίνη (0,25 μ g/ml), τιγκεκυκλίνη (0,075 μ g/ml) κεφοξιτίνη (2 μ g/ml), ριφαμπικίνη (0,50 μ g/ml), και ανθεκτικότητας: ιμιπενέμι (□32 μ g/ml) , θριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη (□256 μ g/ml), λινεζολίδη (48 μ g/ml), εθαμβουτόλη (□256 μ g/ml), σουγμεντιν/κλαβουλανικό οξύ (□256 μ g/ml) και εθοναμίδη (□256 μ g/ml),

## **Βραδέως αναπτυσσόμενα:**

**Δ-4. *M. herakleense* (GN<sub>01</sub>):** Δώδεκα στελέχη από κλινικά δείγματα απομονώθηκαν για πρώτη φορά στο εργαστήριο μας, στα οποία οι βιοχημικές δοκιμασίες, ο έλεγχος ευαισθησίας, η υγρή χρωματογραφία υψηλής ευκρίνειας και τα αποτελέσματα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας να δείχνουν πολλαπλές απομονώσεις του ίδιου στελέχους. Ο προσδιορισμός της αλληλουχία του 16Sr RNA γονιδίου μετά από PCR, ακολουθούμενη από ταυτοποίηση με το λογισμικό BLAST, η 3% διαφορά αλληλουχίας του γονιδίου στόχου heat-shock 65 kD (hsp65) με τα υπόλοιπα μυκοβακτηρίδια, το λιπιδικό προφίλ των μυκολικών οξέων (χρωματογραφία) σε συνδυασμό με τις βιοχημικές δοκιμασίες των μυκοβακτηριδίων αυτών στοιχειοθετούν καινούργιο είδος.

Η χρωματογραφία και η αλληλουχία του γονιδίου hsp65 δείχνει ότι τα στελέχη αυτά είναι διαφορετικά αλλά και σχετικά παρόμοια με το *M. nonchromogenicum*, από το οποίο διαφοροποιήθηκαν και με κλασικές μεθόδους. Προτάθηκε το όνομα ***M. herakleense*** προς τιμή της πόλης όπου απομονώθηκε.

Τα 12 μυκοβακτηρίδια απομονώθηκαν από διαφορετικούς ασθενείς (11 κλινίρεις στο νοσοκομείο και ένας στην κοινότητα). Η πλειοψηφία των ασθενών αυτών ήταν ηλικιωμένα άτομα με σοβαρές χρόνιες ασθένειες. Κανείς από τους ασθενείς δεν ήταν HIV-οροθετικός, αρκετοί είχαν χαμηλό αριθμό λεμφοκυττάρων. Πέντε από τους ασθενείς κατέληξαν σε περίοδο τριών μηνών μετά την απομόνωση του *M. herakleense*. Σύμφωνα με τα κριτήρια της Αμερικανικής Θωρακικής Εταιρίας, κανένας από τους 12 ασθενείς δεν στοιχειοθετεί λοίμωξη από άτυπο μυκοβακτηρίδιο. Όλα τα στελέχη ελέγχθηκαν με τις κλασικούς μεθόδους: χρόνος ανάπτυξης, ανάπτυξη σε διαφορετικές



θερμοκρασίες (22°C, 37 °C, και 42 °C), σε υλικό MacConkey χωρίς crystal violet, σε υλικό LJ με thiophene-2-carboxylic hydrazide (T<sub>2</sub>CH), σε αιματούχο άγαρ. Μια σειρά από βιοχημικές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκε και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα με τις βιοχημικές ιδιότητες των άλλων μυκοβακτηριδίων. **(πίνακας 22)**

Πίνακας 22. Σύγκριση φαινοτυπικών ιδιοτήτων του *Mycobacterium herakleense*

(GN<sub>01</sub>) με αυτά των υπόλοιπων άτυπων μυκοβακτηριδίων.(41,72,109,186)

ΕΙΔΟΣ	Test						Ανάπτυξη	
	Χρωστική	Test Νιασίνης	test Νιτρικών	Test Ουρεάσης	Test Σιδήρου	Test 3ημ. Αρυλ-σουλφ.	T <sub>2</sub> H (1 μg/mL)	Mac Conkey agar
<i>M. herakleum</i> (GN <sub>01</sub> )	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>M. abscessus</i>	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>M. alvei</i>	-	-	+	+	-	+		
<i>M. brumae</i>	-	-	+	+	+	ΔΕ		
<i>M. chelonae</i>	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>M. chrolophenolicum</i>	+	ΔΕ	-	ΔΕ	ΔΕ	+		
<i>M. confluentis</i>	-	ΔΕ	+	+	-	-		
<i>M. elephantis</i>	+	ΔΕ	+	+	ΔΕ	-		
<i>M. fortuitum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>M. frederiksbergense</i>	+	ΔΕ	+	-	ΔΕ	ΔΕ		
<i>M. goodii</i>	V	-	+	ΔΕ	+	-		
<i>M. hassiacum</i>	+	-	-	+	-	-		
<i>M. holderi</i>	+	ΔΕ	-	+	ΔΕ	ΔΕ		
<i>M. holsaticum</i>	-	ΔΕ	+	+	-	-		
<i>M. immunogenum</i>	-	-	-	ΔΕ	-	+		
<i>M. madagascariense</i>	+	ΔΕ	-	+	ΔΕ	+		
<i>M. mageritense</i>	-	ΔΕ	+	+	NH	+		
<i>M. mucogenicum</i>	-	-	+	+	-	+		
<i>M. murale</i>	+	ΔΕ	-	+	ΔΕ	+		
<i>M. nonchromogenicum</i>	-	-	-	-	-	-		
<i>M. novocastrene</i>	+	-	+	+	-	+		
<i>M. peregrinum</i>	-	ΔΕ	+	+	+	+		
<i>M. septicum</i>	-	-	+	ΔΕ	+	ΔΕ		
<i>M. smegmatis</i>	V	-	+	ΔΕ	+	-	+	
<i>M. terrae complex</i>	-	-	+	-	-	-	+	V
<i>M. vanbaalenii</i>	+	ΔΕ	+	+	ΔΕ	-		
<i>M. wolinskyi</i>	-	-	-	ΔΕ	+	-		

ΔΕ, δεν έχει γίνει, V, μεταβλητό,

Το *M. terrae complex* συμπεριλαμβάνει μη-χρωμογόνα, βραδέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια που ανευρίσκονται στο έδαφος. Αποτελείται από το *M. triviale*, *M. nonchromogenicum*, *M. hiberniae*, *M. arupense*, *M. senuense*, *M. kumatonense* και *M. terrae*. Η σύγκριση βιοχημικών ιδιοτήτων του καινούργιου στελέχους *M. herakleense*, με των πλησίον του μυκοβακτηριδίων παρουσιάζεται στον **πίνακας 23**.

**Πίνακας 23. Σύγκριση φαινοτυπικών ιδιοτήτων του *Mycobacterium sp. GN01 (M. herakleense)*, με τα στελέχη του συμπλέγματος *M. terrae complex*. (30,117)**

### ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

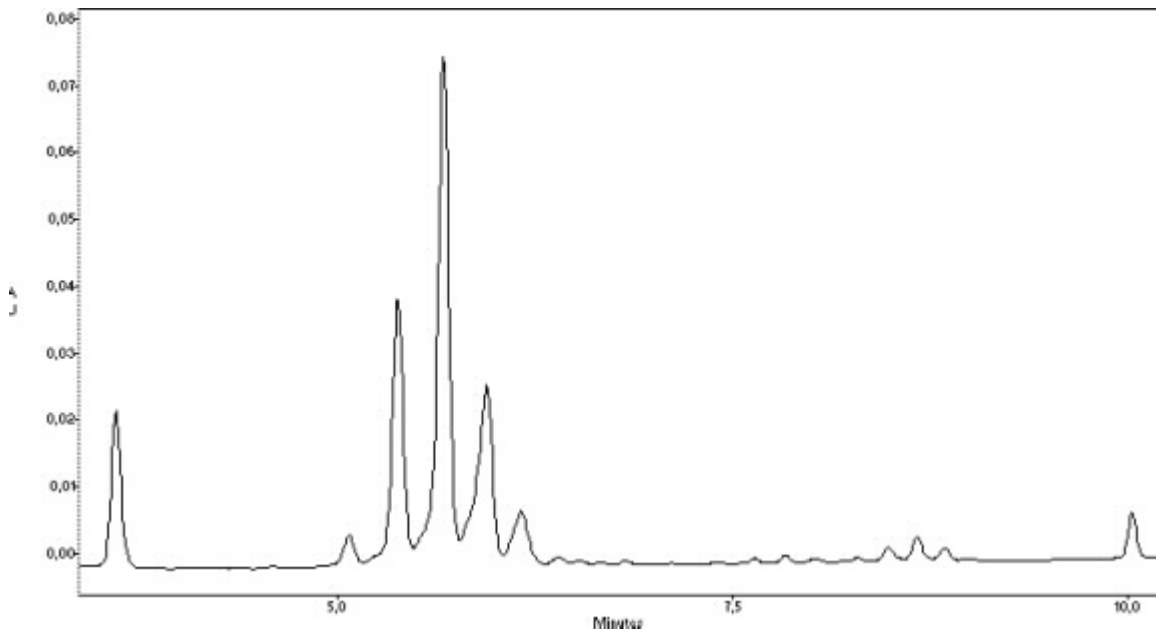
ΕΙΔΟΣ	Χρωσ- τική	Niacin	Nitrate	Urease	Aryl. 3 ημ.	Glu β	Catal. 68°	Tween 80	TCH	Ανάπ- τιξη □ 7ημ.
<i>GN01<sup>T</sup> (M. herakleense)</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	+	7
<i>M. nonchromogenicum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>M. terrae</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>M. triviale</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>M. kumatonense</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>M. arupense</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>M. hiberniae</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. senuense</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+

(+), θετικό; (-), αρνητικό; Aryl, αρυλσουλφατάση; Glu, β-γλυκοσιδάση; Catal., καταλάση; T80, Tween 80 υδρόλυση

Στο στέλεχος πραγματοποιήθηκε η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής ευκρίνειας

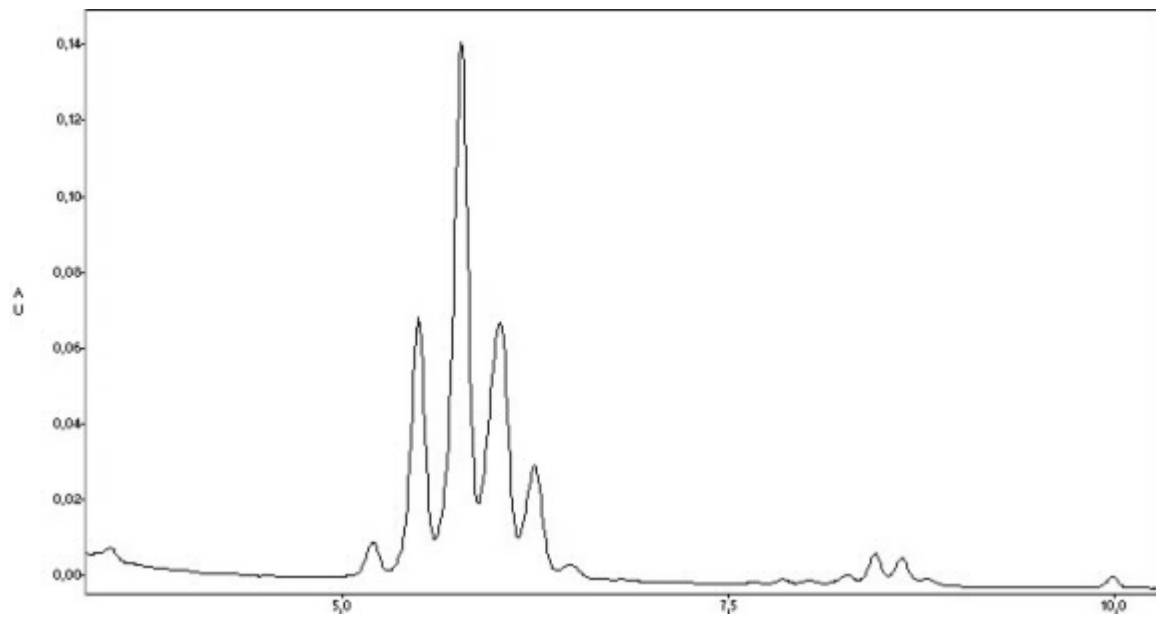
(HPLC) με την ανάλυση υδροξυλιπαρών οξέων. Έγινε σύγκριση των χρωματογραμμάτων του καινούργιου στελέχους με το πλησίον του *M. nonchromogenicum* με τη χρήση βιβλιοθήκης λιπιδιογραφημάτων των μυκοβακτηριδίων. (<http://www.MycobToscana.it>) (εικ.9)

A



*M. nonchromogenicum*

B



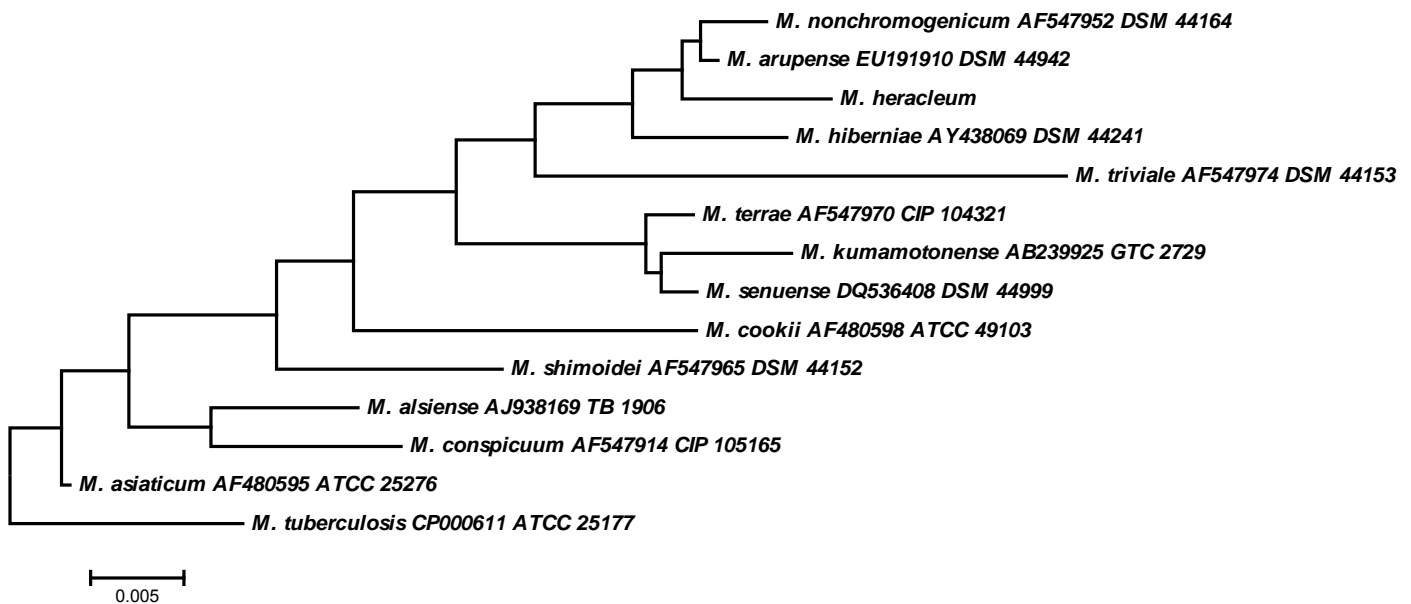
*M. herakleense*

Εικ.9. Σύγκριση των χρωματογραμμάτων (HPLC) του *M. nonchromogenicum* (A) και *M. herakleense* (B)

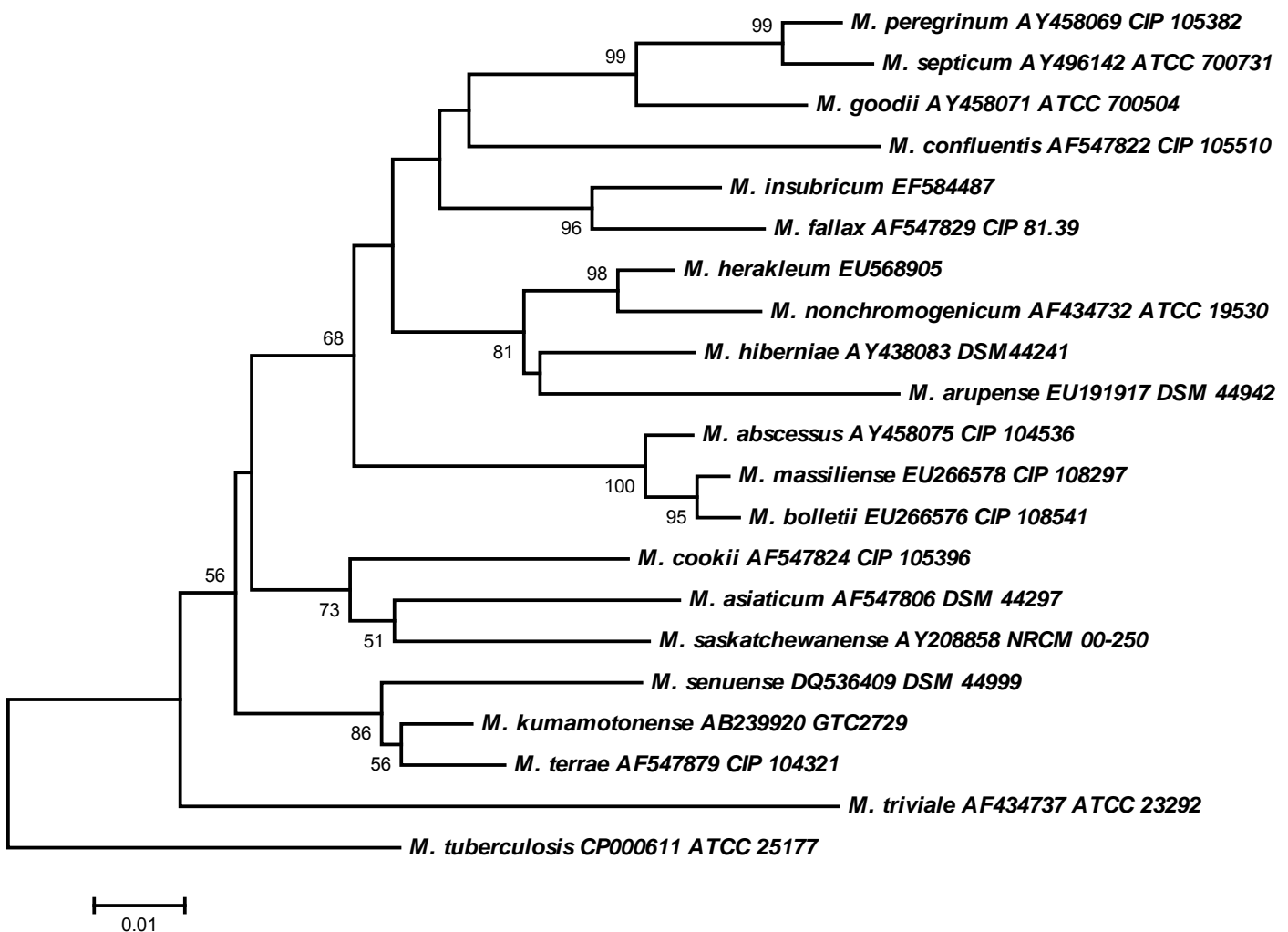
### **Φυλογενετική ανάλυση**

Πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση με τις αλληλουχίες γονοτυπικά σχετικών μυκοβακτηριδίων, καταχωρημένες στην GenBank (GenBank BLAST) με τη χρήση του προγράμματος MEGA (version 4) software. Το δενδρόγραμμα χτίστηκε με τη μέθοδο γειτονικών ενώσεων και με ανάλυση βασισμένη σε 1000 ομοιότητες. (εικ. 10 και 11).

**Εικ. 10.** Δενδρόγραμμα ομοιότητας 12 γνωστών μυκοβακτηριδίων και του νέου στέλεχος *M. herakleense*, βασισμένο στην αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA. Χρησιμοποιήθηκε ως ρίζα ο γονότυπος του *M. tuberculosis*. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει διαφορά 0.5% της γενετικής ομοιότητας μεταξύ των μυκοβακτηριδίων. Η ονομασία τους καταγράφεται αριστερά των αντίστοιχων αριθμών των αλληλουχιών και των αριθμών των στελεχών,



**Εικ. 11.** Φυλογενετικό δένδρο του νέου στέλεχος *M. herakleense*, βασισμένο στις αλληλουχίες του γονιδίου *hsp65*. Χρησιμοποιήθηκε ως ρίζα ο γονότυπος του *M. tuberculosis*. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει διαφορά 1% της γενετικής ομοιότητας μεταξύ των μυκοβακτηριδίων. Η ονομασία τους καταγράφεται αριστερά των αντίστοιχων αριθμών των αλληλουχιών και των αριθμών των στελεχών. Σε κάθε κλάδο του φυλογενετικού δένδρου αναφέρονται διαφορές > 50%.



Προσδιορίστηκε ο έλεγχος αντοχής στα βασικά αντιμυκοβακτηριακά φάρμακα με τη μέθοδο του E-test και με τη μέθοδο αναλογιών. Η μέθοδος ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) έδειξε τις κάτωθι τιμές: αμικασίνη 28  $\mu$  g/ml, κεφοξιτίνη 32  $\mu$  g/ml, σιπροφλαξασίνη 16  $\mu$  g/ml, δοξυκυκλίνη 32  $\mu$  g/ml, ιμιπενέμη 64  $\mu$  g/ml, τριμεθοπρίμη 64  $\mu$  g/ml, λινεζολίδη 64  $\mu$  g/ml, κλαρυθρομυκίνη 64  $\mu$  g/ml, τομπραμυκίνη 32  $\mu$  g/ml.

Η αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA, η απόκλιση  $\square$ 3% στην αλληλουχία του γονιδίου *hsp65*, όταν συγκρίθηκε με αυτές των άλλων μυκοβακτηριδίων, μαζί με τα αποτελέσματα του βιοχημικού και λιπιδικού προφίλ, συνηγορούν ότι το στέλεχος *Mycobacterium GN<sub>01</sub>* αποτελεί καινούργιο είδος. Διαφαίνεται από τα δενδρογράμματα (εικ.6 και εικ.7) και από το λιπιδόγραμμα, το κοντινότερο σε αυτό μυκοβακτηρίδιο να είναι το *Mycobacterium nonchromogenicum*. Στη βάση δεδομένων GenBank έχει καταχωρηθεί με τον αριθμό για την αλληλουχία του γονιδίου *hsp65* 1069511. Ως νέο στέλεχος έχει κατατεθεί σε δύο τράπεζες φύλαξης βακτηριδίων: της BCCM/LMG Bacteria collection (Belgium), με τον αριθμό **LMG 24735**, της National Collection of Type Cultures (NCTC) UK με τον αριθμό **NCTC 13432**.

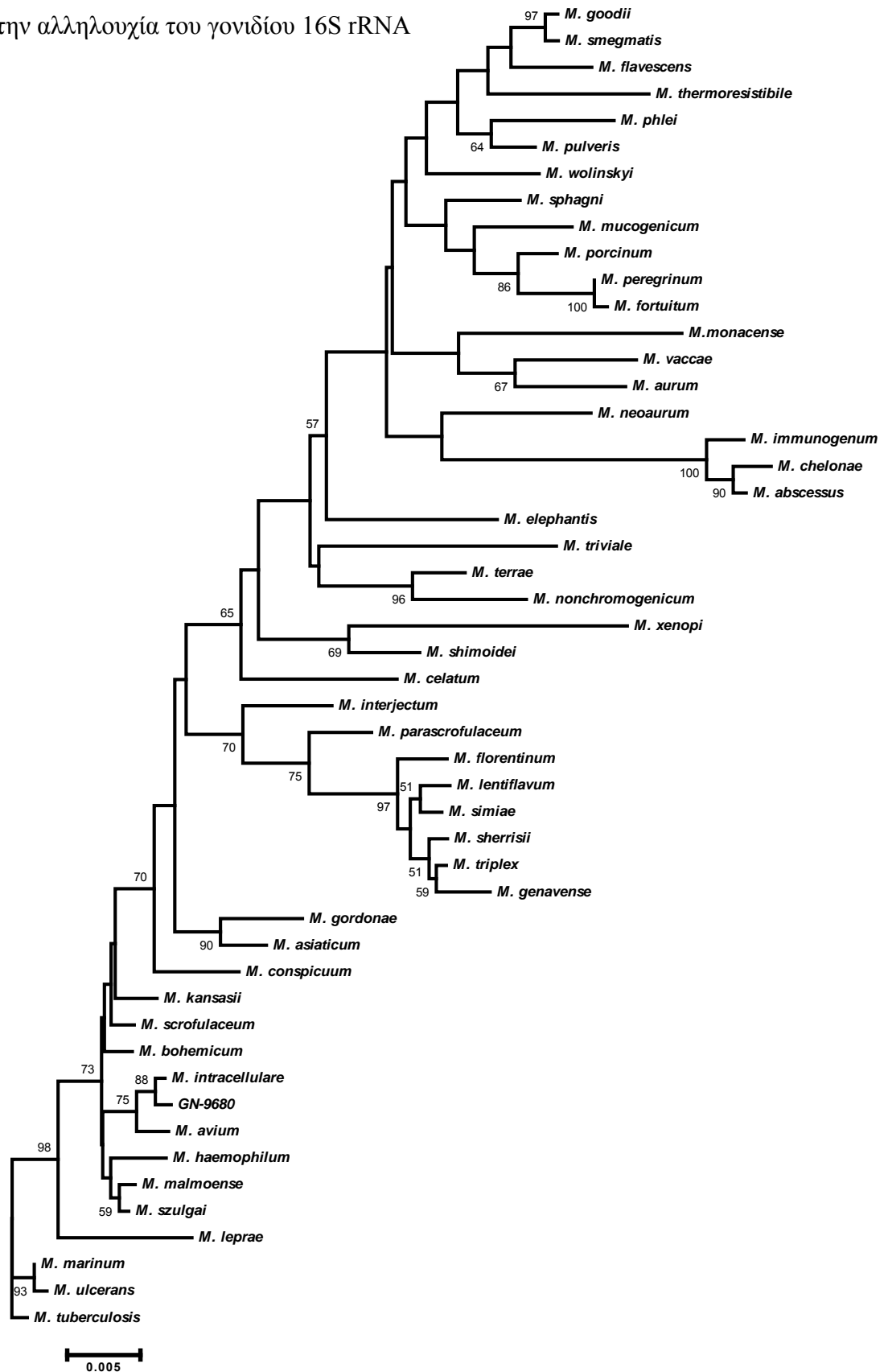
**Δ-5. GN-9680:** Το μυκοβακτηρίδιο απομονώθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο από πτύελα ασθενούς με έξαρση χρόνιας πνευμονοπάθειας. Το στέλεχος, μη χρωμογόνο, βραδέως αναπτυσσόμενο, δεν αναπτύσσεται στο υλικό McConkey άνευ κρυστάλ βιολέ αλλά ούτε και στους 45°C. Η αναγωγή νιτρικών, παραγωγή θερμοανθεκτικής καταλάσης, Αρυλ-σουλφατάσης, υδρόλυση Tween 80, βγήκαν αρνητικές, η παραγωγή ουρεάσης: Θετική. Με τη μοριακή τεχνική Accuprobe *Mycobacterium avium* και *Mycobacterium intracellulare* παρουσίασε αρνητικό



αποτέλεσμα ενώ με το Accuprobe *Mycobacterium avium* complex: θετικό. Η άλλη εμπορική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε, GenoType CM και AS, παρουσίασε θετικές γραμμές στις θέσεις: 1,2,3 και στα δύο κιτ, χωρίς να μπορέσει να δώσει ακριβή ταυτοποίηση. Ο προσδιορισμός της αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου μετά από PCR, κατατέθηκε στην βάση δεδομένων GenBank υπό αριθμό **FJ425227**, επίσης και στις τράπεζες φύλαξης βακτηριδίων: BCCM/LMG Bacteria (Belgium) υπό αριθμό **LMG 24834**, CECT Valencia, Espania υπό αριθμό **CECT 7461**. Η αλληλουχία του γονιδίου στόχου heat-shock 65 kD (hsp65) κατατέθηκε στην GenBank υπό αριθμό **FJ425228**. Ο έλεγχος ευαισθησίας με τη μέθοδο του E-test, ανάγνωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα: κλαριθρομυσίνη (0,75  $\mu$  g/ml), σιπροφλοξασίνη (0,19  $\mu$  g/ml), εθιουναμίδη (0,032 $\mu$ g/ml), αμοξικ./κλαβουλανικό οξύ (0,19  $\mu$  g/ml), τριμεθ./σουλφομεθοξαζόλη (0,75  $\mu$  g/ml), στρεπτομυκίνη (0,50  $\mu$  g/ml), αμικασίνη (12,0  $\mu$  g/ml), ριφαμπικίνη (12,0  $\mu$  g/ml), εθαμβουτόλη (4,0  $\mu$  g/ml), δοξυκυκλίνη (24,0  $\mu$  g/ml), λεβοφλοξασίνη (32,0  $\mu$  g/ml).

Πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση με τις αλληλουχίες γονοτυπικά σχετικών μυκοβακτηριδίων, καταχωρημένες στην GenBank (GenBank BLAST) με τη χρήση του προγράμματος MEGA (version 4) software. Η εικόνα 8 δείχνει το δενδρόγραμμα του νέου στελέχους GN-9680 το οποίο βρίσκεται κοντινότερα στο *M. intracellulare*.

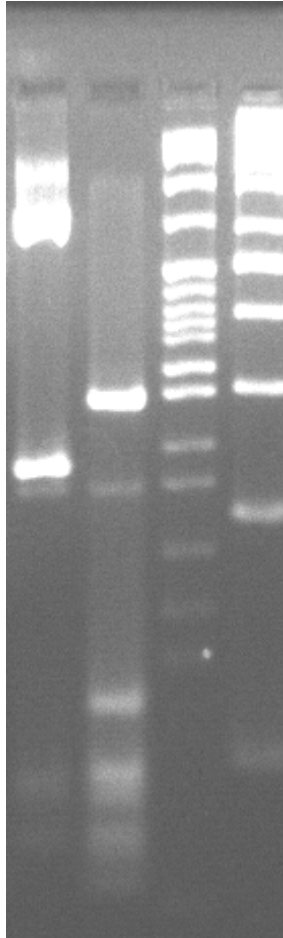
Εικ. 12 Δενδρόγραμμα ομοιότητας του νέου στελέχους GN-9680. βασισμένο στην αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA



**Δ-6. *M. arupense*:** Το *M.arupense* είναι καινούργιο είδος μυκοβακτηρίδιο το οποίο τυποποιήθηκε για πρώτη φορά από κλινικά δείγματα το 2006 και έκτοτε ανιχνεύεται σπάνια σε δείγματα ασθενών. Απομονώθηκαν δύο μυκοβακτηρίδια *M. arupense* στο εργαστήριο:

**α) *M. GN-9722*:** απομονώθηκε από 62-χρονο ασθενή καρδιολογικής κλινικής με ιστορικό ανεπάρκειας μιτροειδούς και κλινικής εικόνας δύσπνοιας, αιμόπτυσης και διαλείπον εμπύρετο. Η ακτινογραφία θώρακος παρουσίασε εκτεταμένες αμφίπλευρες διηθήσεις, ιδιαίτερα στα μέσα πνευμονικά πεδία, αμφίπλευρη πλευριτική συμμετοχή ύπαρξη πλευριτικού υγρού άνευ κακοήθων κυττάρων και μικρή περικαρδική συλλογή. Η αξονική τομογραφία έδειξε όγκο του αριστερού νεφρού με ασβεστώσεις, ύποπτος για κακοήθεια. Η ταχύτητα καθίζησης ερυθρών βρέθηκε αυξημένη (63 χιλ./1 ώρα), όπως η CRP (21,75mg/dl) και η κρεατινίνη (4,1 mg/dl). Οι καλλιέργειες ήταν αρνητικές για κοινά μικρόβια. Μία καλλιέργεια πτυέλων στάλθηκε μόνο για έλεγχο μυκοβακτηριδίων και αμέσως μετά χορηγήθηκε στον ασθενή εμπειρική θεραπεία (λεβοφλοξασίνη, πιπερασιλίνη/ταζομπακτάμη και κλαρυθρομυκίνη), με αποτέλεσμα κλινική βελτίωση ασθενής, μετά από δύο εβδομάδες θεραπείας, εξήλθε από το νοσοκομείο με βελτίωση. Απομονώθηκε το *M. arupense* από το μοναδικό δείγμα πτυέλων, το οποίο δεν μπορούσε να τυποποιηθεί με τα συμβατικά βιοχημικά τεστ, αλλά ούτε και με τις εμπορικές μοριακές τεχνικές. Το βιοχημικό του προφίλ έδειξε ομοιότητα με τα υπόλοιπα προσδιορισμένα στελέχη *M. arupense* (αρνητικές τις δοκιμασίες αναγωγή νιτρικών, 3-ήμερη Αρυλσουλφατάση, ουρεάση, ανάπτυξη σε υλικό McConkey άνευ κρυστάλ βιολέ, ανάπτυξη στους 42°C και θετική την β-γαλακτοσιδάση). Η μοριακή τεχνική AccuProbe, έδειξε αρνητικό αποτέλεσμα με όλα τα διαθέσιμά της κιτ Ο έλεγχος με την άλλη

εμπορική τεχνική GenoType CM και AS παρουσίασε τις γραμμές 1,2,3 και 10, και 1,2,3 και 12 αντίστοιχα, χωρίς να μπορεί να προσδιορίσει κάποιο μυκοβακτηρίδιο. Το στέλεχος τελικά ταυτοποιήθηκε με τη μέθοδο του προσδιορισμού (sequencing) της αλληλουχίας των γονιδίων 16Sr RNA και *hsp65*. Στον αυτόματο DNA αναλυτή (3730 DNA analyzer, Applied Biosystems), πολλαπλασιάστηκε προϊόν 1340-ζεύγη βάσεων, σχεδόν ολόκληρο το γονίδιο 16Sr RNA. Η σύγκριση της αλληλουχίας με άλλες στη βάση δεδομένων GenBank έδειξε ομοιότητα 100% (1340/1340) με το στέλεχος *M. arupense* (AR30097), 99,9% (1339/1340) ομοιότητα με το στέλεχος *M. arupense* (CST7052). Επιπρόσθετο, κομμάτι 439-ζεύγη βάσεων του γονιδίου *hsp65*, πολλαπλασιάστηκε με τους εναρκτές Tb1 και Tb2. Η σύγκριση της αλληλουχίας έδειξε ομοιότητα 100% (386/386) με το στέλεχος *M. arupense* FI-05354 και 99% (419/422) με αρκετά στελέχη *M. arupense* όπως AR30097, CST7052, CST0506. Οι αλληλουχίες των γονιδίων 16Sr RNA και *hsp65*, κατατέθηκαν στη τράπεζα βάσης δεδομένων με τους αύξοντα αριθμούς **FJ403044** και **FJ263631** αντίστοιχα. Το πολλαπλασιασμένο με PCR προϊόν του γονιδίου *hsp65* (12μL) επεξεργάστηκε με τα περιοριστικά ένζυμα HaeIII και BstE□. Το περιοριστικό μίγμα έτρεξε σε τζελ αγαρόζης 3,5% metaphor (Camprex Bioscience, Rockland, INC.) σε 100 V. Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BstE□ παρήγαγε δύο κομμάτια των 325 και 115 ζεύγη βάσεων και με το ένζυμο HaeIII τέσσερα κομμάτια των 145,60, 50 και 40 ζεύγη βάσεων (εικ.8). Ο έλεγχος ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του E-test και έδειξε τις ακόλουθες ανασταλτικές πυκνότητες: αμικασίνη (1μg/ml), σιπροφλοξασίνη (4 μg/ml), κλαρυθρομυκίνη (0,25 μg/ml), εθαμβουτόλη (0,032μg/ml), εθοναμίδη (0,25μg/ml), λινεζολίδη (8 μg/ml),



B H L1 L2

**Εικ.13** Ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης του *M. arupense*, των πολλαπλασιασμένων με PCR-RFLP προϊόντων του γονιδίου της πρωτεΐνης του θερμικού shock (*hsp65*) με τα περιοριστικά ένζυμα BstE $\square$  (γραμμή B) και HaeIII (γραμμή H), γραμμή L1: μοριακοί δείκτες βάρους pBR322 DNA-MspI Digest (New England Biolabs); γραμμή L2: GeneRuler 50-bp DNA ladder (Fermentas)

**β ) M. GN-10546:** Το στέλεχος απομονώθηκε από μοναδικό κλινικό δείγμα ασθενούς, 51 ετών από τη Μονάδα Τεχνητού Νεφρού. Η αρχική οξεάνοχη χρώση ήταν αρνητική και το βιοχημικό προφίλ όμοιο με τα υπόλοιπα *M. arupense* στη βιβλιογραφία: (αρνητικές η αναγωγή νιτρικών, παραγωγή ουρεάση, παραγωγή ημιποσοτικής καταλάσης, αρυλσουλφατάση 3-ημ., ανάπτυξη σε υλικό McConkey, υδρόλυση Tween 80 και θετική η κατάλαση στους 68°C). Ο έλεγχος ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του E-test και έδειξε τις ακόλουθες ανασταλτικές πυκνότητες: αμικασίνη (64μg/ml), σιπροφλοξασίνη (16 μg/ml), κλαρυθρομυκίνη (0,19 μg/ml), εθαμβουτόλη (128μg/ml), εθοναμίδη (128μg/ml), λινεζολίδη (32 μg/ml), λεβοφλοξασίνη (32 μg/ml), ριφαμπικίνη (256 μg/ml), κεφοξιτίνη (0,5 μg/ml) και τριμ/σουλφομεθοξαζόλη (□32 μg/ml), δοξκυκλίνη (12 μg/ml), ισονιαζίδη (256 μg/ml), τιγκεκυκλίνη (256 μg/ml). Η οριστική τυποποίηση έγινε με τη μέθοδο προσδιορισμού της αλληλουχίας των γονιδίων 16Sr RNA και *hsp65*. Η σύγκριση των αλληλουχιών έδειξε ομοιότητα 99% με *M. arupense* και μία βάση διαφορά με το *M.GN01*. Οι αλληλουχίες κατατέθηκαν στη τράπεζα βάσεις δεδομένων με τους παρακάτω αύξοντες αριθμούς: **1155867** για το γονίδιο 16SrRNA και **1155864** για το γονίδιο *hsp65*.

### 3. Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΤΥΠΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ

Λίγα αντιφυματικά φάρμακα είναι αποτελεσματικά στα άτυπα μυκοβακτηρίδια. Τα αντιβιοτικά που συστήνει για έλεγχο ευαισθησίας η επιτροπή NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards=Εθνική Επιτροπή για Κλινικά Εργαστηριακά Πρότυπα), αντανακλά τις θέσεις της Αμερικανικής Θωρακικής Εταιρίας και το CDC (Κέντρο Ελέγχου Λοιμώξεων). Δεν υπάρχουν γενικώς αποδεκτά σχήματα θεραπείας για λοιμώξεις από Ταχέως- αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια Σύμφωνα με τις οδηγίες της Αμερικανικής Θωρακικής Εταιρίας, 8 αντιμικροβιακές ουσίες (αμικασίνη, τομπραμικίνη, κλαριθρομικίνη, σιπροφλοξασίνη, δόξικικλίνη, κεφοξιτίνη, ιμιπενέμη και σουλφομεθοξαζόλη), καλύπτουν το αντιβιογράμμα για τα Ταχέως αναπτυσσόμενα. Για τα Βραδέως αναπτυσσόμενα, όπως το MAC, συνιστάται μόνο η κλαριθρομικίνη, για το *M. kansasii*, μόνο η ριφαμικίνη για το αρχικό τεστ ευαισθησίας, για το σύνολο των υπολοίπων Βραδέως αναπτυσσομένων, ισχύουν οι οδηγίες για το *M. kansasii*. Εφόσον υπάρχει αντοχή, να πραγματοποιείται ο έλεγχος ευαισθησίας και σε άλλα φάρμακα της δεύτερης γενιάς αντί-TB, όπως αμικασίνη, σιπροφλοξασίνη, κλαριθρομικίνη, ριφαμβουτίνη, σουλφοναμίδες και σε στρεπτομυκίνη, ισονιαζίδι, εθαμβουτόλη Από τα υπόλοιπα Βραδέως αναπτυσσόμενα υπάρχουν οδηγίες για το *M. marinum*, μετά από αποτυχία της δοθείσας θεραπείας, να γίνεται τεστ ευαισθησίας στη ριφαμικίνη και εθαμβουτόλη. Υπάρχει όμως μεγάλη διαφορετικότητα στην αντοχή μεταξύ στελεχών. Τα αντιβιοτικά που επιλέγονται είναι ανάλογα της ταχύτητας ανάπτυξης των μυκοβακτηριδίων που εξετάζονται: για **ταχέως αναπτυσσόμενα** και για **βραδέως αναπτυσσόμενα** In vitro πληροφορίες για τις ευαισθησίες είναι σημαντικές για τη

θεραπευτική αγωγή σε ατομικό επίπεδο. Ο πίνακας 22 συνοψίζει την Ελάχιστη Ανασταλτική Πυκνότητα (MIC) δεκατεσσάρων (14) Αντιμικροβιακών ουσιών έναντι 51 Ταχέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια σε ομάδες 7 διαφορετικών ειδών, προσδιορισμένα με τη μέθοδο του E-test.

<b>Πίνακας 24. In vitro ευαισθησία των 14 αντιμυκοβακτηριακών ουσιών των 51 Ταχέως- Αναπτυσσόμενα Μυκοβακτηρίδια, με τη μέθοδο του Etest.</b>								
		<b>% ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ</b>						
<b>Αντιμυκο- βακτηριακές ουσίες</b>	<b>MIC μg/ml</b>	<b>Fortui- tum α=26</b>	<b>Pereg- rinum α=9</b>	<b>Chelo- nae α=7</b>	<b>Abse- sus α=5</b>	<b>Thermo- resistible α=1</b>	<b>Muco- genic α=2</b>	<b>Euro- paeum α=1</b>
Amikacin	≤16	92 <sub>24/26</sub>	89 <sub>8/9</sub>	57 <sub>4/7</sub>	100	100	100	100
Tobramycin	≤4	61 <sub>16/26</sub>	67 <sub>6/9</sub>	100	40 <sub>2/5</sub>	100	50 <sub>1/2</sub>	0
clarithromycin	≤2	88 <sub>23/26</sub>	100	100	80 <sub>4/5</sub>	100	50 <sub>1/2</sub>	100
Azithromycin*	≤2	81 <sub>21/26</sub>	78 <sub>8/9</sub>	71 <sub>5/7</sub>	40 <sub>2/5</sub>	100	50 <sub>1/2</sub>	0
Ciprofloxacin	≤1	100	100	0 <sub>0/7</sub>	40 <sub>2/5</sub>	100	50 <sub>1/2</sub>	100
Sparfloxacin*	≤1	100	100	14 <sub>1/7</sub>	40 <sub>2/5</sub>	100	50 <sub>1/2</sub>	100
Levofloxacin*	≤2	100	100	0 <sub>0/7</sub>	40 <sub>2/5</sub>	100	50 <sub>1/2</sub>	100
Doxycycline	≤1	85 <sub>22/26</sub>	89 <sub>8/9</sub>	28 <sub>2/7</sub>	0 <sub>0/5</sub>	100	0	100
Tigecycline*	≤4	100	100	100	100	100	100	0
Linezolid*	≤8	92 <sub>24/26</sub>	89 <sub>8/9</sub>	43 <sub>3/7</sub>	20 <sub>1/5</sub>	0	100	0
Cefoxitin	≤16	100	78 <sub>8/9</sub>	14 <sub>1/7</sub>	20 <sub>1/5</sub>	100	100	0
Imipenem	≤4	100	100	0	20 <sub>1/5</sub>	100	100	0
AMC*	≤16	96 <sub>25/26</sub>	100	0	0	100	100	0
TMP/SMZ*	≤32	73 <sub>19/26</sub>	67 <sub>6/7</sub>	0	0	100	100	0

Συντομεύσεις: TMP/SMZ, trimethoprim-sulfamethoxazole; AMC, amoxicillin-clavulanic, Mucogenic, Mucogenicum



Δείκτες ευαισθησίας όπως ορίζει το έγγραφο της επιτροπής NCCLS για τα μυκοβακτηρίδια.

\*Μη αναγνωρισμένα από την επιτροπή NCCLS δείκτες ευαισθησίας για μυκοβακτηρίδια: την azithromycin όπως συνιστά η επιτροπή NCCLS για τους δείκτες ευαισθησίας για τα αερόβια βακτήρια, για τις άλλες δύο κινολόνες, όπως προσδιόρισε ο Sanchez-Carrillo et all (32), για τη σπαρφλοξασίνη, και η Brown-Elliot και Wallace για τη λεβοφλοξασίνη (30), για τη τιγκεξικλίνη όπως το προσδιόρισε ο Wallace et all (12), για τη λινεζολίδη όπως συνιστά η Brown-Elliot et all (11, 23) και για την AMC όπως προτείνει ο Wallace et all (9, 25).

Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα της μελέτης για τα Ταχέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια, το δραστικότερο φάρμακο ήταν η αμικασίνη με 92% ευαισθησία για τα *M. fortuitum*, 89% για τα *M. peregrinum*, 100% για τα *M. abscessus* και 57% για τα *M. chelonae*. Η Τομπραμικίνη παρουσιάστηκε λιγότερο δραστική στα *M. fortuitum* (61%), στα *M. peregrinum* (78%), στα *M. abscessus* (40%), αλλά 100% ευαίσθητη για τα *M. chelonae*. Στην ομάδα των μακρολίδων η κλαριθρομικίνη ήταν πιο δραστική ουσία από ότι η αζιθρομικίνη και με καλή δραστικότητα έναντι όλων των Ταχέως αναπτυσσόμενων: 88% και 80% για *M. fortuitum* και *M. abscessus* αντίστοιχα, και 100% για τα υπόλοιπα Ταχέως αναπτυσσόμενα. Οι ομάδες των *M. fortuitum* και *M. peregrinum* παρέμειναν εντόνως ευαίσθητες και στις τρεις κινολόνες που ελέχθησαν. Και οι τρεις κινολόνες δεν ήταν αρκετά δραστικές in-vitro για τα *M. chelonae* και *M. abscessus*, 0% και 40% αντίστοιχα, με τη σπαρφλοξασίνη 14% ευαίσθητη για τα *M. chelonae*. Η δοξικυκλίνη έδειξε καλή ευαισθησία στην ομάδα των *M. fortuitum* (85%). Η τιγκεκυκλίνη, η καινούργια γλυκιλκυκλίνη της οικογένειας των τετρακυκλίνων, έδειξε άριστη

δραστικότητα (100%) έναντι όλων των Ταχέως αναπτυσσόμενων ειδών, πλην του ενός καινούργιο στέλεχος *M. europaeum*, το οποίο δεν αναιρεί τη σπουδαιότητα του νέου αυτού φαρμάκου. Η λινεζολίδη εμπόδισε την ανάπτυξη των *M. fortuitum* και *M. peregrinum* σε ποσοστά 92% και 89% αντίστοιχα. Με εξαίρεση το *M. mucogenicum*, δεν έδειξε δραστηριότητα σε άλλο Ταχέως αναπτυσσόμενο. Οι β-λακτάμες αντιπροσωπεύτηκαν από τρεις αντιβακτηριδιακές ουσίες: κεφοξιτίνη, ιμιπενέμη και αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ με δραστηρότερη την ιμιπενέμη, αλλά γενικά έδειξαν ευαισθησία μόνο στα *M. fortuitum* και *M. peregrinum*. Αναλυτικότερα η κεφοξιτίνη παρουσίασε 100%, 78%, 14% και 20% για τα *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* και *M. abscessus* αντίστοιχα, η ιμιπενέμη: 100%, 100%, 0% και 20%, η αμοξ./κλαβ.: 96%, 100%, 0% και 0% για τα αντίστοιχα μυκοβακτηρίδια. Η τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη έδειξε μέτρια έως καθόλου ευαισθησία στα σύνθετα Ταχέως αναπτυσσόμενα: 73%, 67%, και 0% για τα *M. fortuitum*, *M. peregrinum* και μαζί *M. chelonae*, *M. abscessus*, αντίστοιχα. Τα στελέχη *M. thermoresistibile* και το ένα από τα δύο *M. mucogenicum* παρουσίασαν πολύ καλή ευαισθησία στα φάρμακα, ενώ το νέο στέλεχος *M. europaeum*, έδειξε ένα φαινότυπο αντοχής που συμπεριέλαβε τη τομπραμυκίνη, αζιθρομυκίνη, τιγκεκυκλίνη, λινεζολίδη, κεφοξιτίνη, ιμιπενέμη, αμοξ/κλαβ, και τριμ/σουλφ.

Ο πίνακας 25 συνοψίζει τις ευαισθησίες 89 Βραδέως αναπτυσσομένων μυκοβακτηριδίων, (σε ομάδες των 11 διαφορετικών ειδών), σε 13 αντιβακτηριδιακές ουσίες, με τη μέθοδο του Etest. Οι αντιβακτηριδιακές ουσίες συμπεριλάμβαναν τις ακόλουθες ομάδες και αντιβιοτικά: την αντί-φυματική ομάδα που περιείχε τα πρώτης γραμμής φάρμακα (ριφαμπικίνη, ισονιαζίδη, εθαμβουτόλη, στρεπτομυκίνη), την

αμινιγλυκοσιδη (αμικασίνη), των μακρολίδων (κλαρυθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη), των κινολονών (σιπροφλόξασιν, λεβοφλόξασιν, σπαρφλόξασιν), τη γλυκυλκυκλίνη της ομάδας των τετρακυκλίνων (τιγκεκυκλίνη), την οξαζολιδινόνη (λινεζολίδη), την εθιωναμίδη και τη σουλφοναμίδη (τριμεθοπριμ/σουλφομεθοξαζόλη).

Πίνακας 25. In vitro ευαισθησία 13 αντιμυκοβακτηριακών ουσιών των 89 Βραδέως- αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια, με τη μέθοδο του Etest.												
% ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ												
Ουσία	MIC mg/ml	Av α/24	Intr α/4	Scr α/1	Kan α/4	Mar α/1	Mal α/1	Xen α/1	Len α/10	Gor α/29	Aru α/2	Her α/12
RIF	≤ 1	0	0	100	100	100	100	100	0	100	0	0
IZH	≤ 5	42 10/24	0	0	75 3/4	0	0	0	0	0	0	0
ETB	≤ 5	25 6/24	0	100	75 3/4	100	0	100	0	100	100	100
SM	≤ 10	87 21/24	0	0	75 3/4	100	100	100	0	31 9/29	0	100
AK	≤ 10	87 21/24	0	100	100	100	0	100	0	79 23/29	0	0
CH*	≤ 8	100	75 3/4	100	100	100	100	100	100	100	100	0
AZ*	≤ 32	100	75 3/4	100	75 3/4	100	100	100	100	100	100	0
CIP	≤ 2	0	0	0	75 3/4	0	100	100	40 4/10	100	0	0
SO	≤ 2	25 6/24	0	0	100	0	100	100	40 4/10	100	0	0
LEV	≤ 2	17 4/24	0	0	100	0	100	100	40 4/10	100	0	0
TGC*	≤ 8	0	0	0	0	0	100	100	0	48 14/29	0	0
LZ*	≤ 8	0	0	100	100	100	100	0	0	86 25/29	0	100
ETH	≤ 10	100	0	100	75 2/3	100	100	100	40 4/10	83 24/29	50 1/2	0
T/S	≤ 32	58 14/24	100	100	100	100	0	100	0	65 19/29	0	0

Συντομεύσεις: Av, Avium, Intr, Intacellulare, Scr, Scrofullaceum, Kan, Kansasii, Mar, Marinum, Mal, Malmonse, Xen, Xenopi, Len, Lentiflavum, Gor, Gordonae, Aru, Arupense, Herakleum, Her. RIF, rifampicin, IZH, isoniazid, ETB, ethambutol, SM, streptomycin, AK, amikacin, CH, clarithromycin, AZ, Azithromycin, CIP, ciprofloxacin, SO, sparfloxacin, LEV, levofloxacin, TGC, tigecycline, LZ, Linezolid, ETH, ethionamid, T/S, trimethoprim/sulfamethoxazol.

Δείκτες ευαισθησίας όπως ορίζει το έγγραφο της επιτροπής NCCLS μυκοβακτηρίδια, ref. (123,124)

\*Μη-αναγνωρισμένα από την επιτροπή NCCLS αντιμυκοβακτηριακά φάρμακα και οι δείκτες ευαισθησίας τους: για την clarithromycin για MAC, όπως προτείνει ο Heifets και άλλοι και ref. (3,76,103), για την azithromycin ref. (31), για την tigecycline ref. (198), για τη linezolid ref. (16,194).

Όπως διαφαίνεται από τον **πίνακα 25** δεν υπάρχει συγκεκριμένος φαινότυπος αντοχής των αντιμυκοβακτηριδιακών ουσιών έναντι των άτυπων (βραδέως αναπτυσσομένων) μυκοβακτηριδίων. Άριστη δράση παρουσίασαν οι μακρολίδες (100%), με ελάχιστα καλύτερη αυτή της κλαρυθρομυκίνης έναντι της αζιθρομυκίνης, με εξαίρεση τα στελέχη *M. intracellulare* (75%) και τα καινούργια είδη *M. herakleense* (0%). Δεν παρουσίασαν δράση η ισονιαζίδη, καθώς και η τιγκεκυκλίνη, ενώ η τελευταία είχε άριστη δράση έναντι των ταχυμυκοβακτηρίων. Οι κινολόνες επίσης δεν παρουσίασαν καλές ευαισθησίες (από μηδενική για την ομάδα MAC, *M. marinum*, *M. arupense*, *M. herakllense*, 40% για τα *M. lentiflavum*, και 100% μόνο για τα *M. gordonae*. Η ριφαμπικίνη ήταν αποτελεσματική για τα μισά είδη στελεχών (*M. kansasii*, *M. gordonae*, και στα μοναδικά είδη *M.*

*scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. malmonse*, *M. xenopi*). Καλύτερη ευαισθησία έδειξε η εθαμβουτόλη απ ότι η ριφαμπικίνη. Οι στρεπτομυκίνη και η αμικασίνη παρουσίασαν μέτρια ευαισθησία και σε διαφορετικά είδη μυκοβακτηριδίων. Η στρεπτομυκίνη είχε δράση έναντι *M. avium* και *M. kansasii* (87%), έναντι *M. marinum*, *M. malmonse*, *M. xenopi*, *M. Herakllense*, (100%), και μηδενική για *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. malmonse*, *M. xenopi* και *M. arupense*. Η αμικασίνη, επιπρόσθετο, ήταν ευαίσθητη για τα στελέχη *M. scrofulaceum* και *M. kansasii*, και καθόλου για τα στελέχη *M. malmonse* και *M. herakleense*. Για τα στελέχη *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. malmonse* και *M. herakleense*, η λινεζολίδη έδειξε καλή δραστηριότητα και καμία για τα *M. xenopi*, *M. lentiflavum* και *M. arupense*, για τα *M. gordonae* - 86%. Αρκετά καλή ήταν η ευαισθησία της εθουναμίδης για το σύνολο των Βραδέως αναπτυσσομένων με 100% για τα *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. malmonse*, *M. xenopi*, 83% για τα *M. gordonae*, 75% για τα *M. kansasii*, ενώ 40% για τα *M. lentiflavum*. Επίσης καλή ήταν η ευαισθησία της τριμεθοπρίμη/σουλφομετοξαζόλη με ευαισθησία 100% για τα *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. xenopi*, 65% για τα *M. gordonae*, και 58% για τα *M. avium*. Το πιο ανθεκτικό βραδέως αναπτυσσόμενο μυκοβακτηρίδιο βρέθηκε το *M. intracellulare*, και ακολουθούν τα *M. herakleense*, *M. lentiflavum*, *M. arupense*. Η φυσική αντοχή των μυκοβακτηριδίων οφείλεται κατά μεγάλο μέρος στη δομή του τοιχώματός των, με τα είδη που συναντώνται στο έδαφος να εμφανίζουν πολύ μικρή διαπερατότητα για την προστασία τους.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε συχνότητα απομόνωσης *Mycobacterium tuberculosis* 3,02%, περίπου το ίδιο ποσοστό και με τα άλλα Ελληνικά νοσοκομεία. Το έτος 2001 ήχε την υψηλότερη επίπτωση της Φυματίωσης, 5,8%, αποτέλεσμα το οποίο συμπίπτει με την αθρόα μετανάστευση αλλοδαπών που έγινε στην Ελλάδα. Διαφαίνεται τάση αύξησης της ζήτησης δειγμάτων για μυκοβακτηρίδια τα τελευταία τρία χρόνια. Σχεδόν διπλασιάστηκαν τα δείγματα που εξετάστηκαν το 2007 σε σύγκριση με το 2004, με ανοδική ή πτωτική τάση του ποσοστού των θετικών δειγμάτων. Ανάλυση του συνόλου των δειγμάτων, ανάλογα με την κλινική από την οποία αποστέλλονταν, έδειξε ότι το 49,6% προέρχονταν από την Πνευμονολογική κλινική, το 12,5% από τα εξωτερικά ιατρεία, το 9.5% από την Α.Παθολογική. Επίσης, το 41,9% ήταν πτύελα και το 69,86% προέρχονταν από το αναπνευστικό σύστημα, όπως ήταν αναμενόμενο. Τα ποσοστά των θετικών δειγμάτων για κάθε τμήμα ήταν στατιστικά πολύ σημαντικές με τις χειρουργικές κλινικές και την Α.Παθολογική να έχουν τα περισσότερα ποσοστά θετικών δειγμάτων. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται από καλύτερα διαγνωστικά κριτήρια εντολής εξέτασης, ενώ στις Πνευμονικές και Παθολογικές, σε κάθε διαγνωστικό πρόβλημα επιδιώκεται ο αποκλεισμός της Φυματίωσης. Μελετήθηκαν συνολικά 179 MTB στελέχη, προερχόμενοι από ισάριθμες πρωτοδιαγνωσθείσες TB περιπτώσεις, 95 προέρχονταν από την Πνευμονική, 30 από την Α.Παθολογική, 10 από τα εξωτερικά ιατρεία, 7 από την Ορθοπαιδική. Τα δείγματα του αναπνευστικού αντιπροσώπευαν το συχνότερο κλινικό δείγμα 143/179 (80%).

Η μελέτη υπογραμμίζει μερικές βασικές δημογραφικές και εργαστηριακές διαφορές μεταξύ των Ελλήνων και ξένων ασθενών με TB. Το ουσιαστικότερο εύρημα στην

οκτάχρονη σπουδή είναι η σημαντική αύξηση των περιπτώσεων με φυματίωση μεταξύ των μεταναστών, καθώς και τα επίπεδα αντοχών τους στα αντιφυματικά φάρμακα ενώ για τους Έλληνες ασθενείς, οι περιπτώσεις με φυματίωση μειώνονται, με παράλληλη αύξηση των αντοχών στα αντιφυματικά φάρμακα.

Τα ποσοστά των πρωτοδιαγνωσθεισών περιπτώσεων φυματίωσης στην Κρήτη κατά τη διάρκεια της β περιόδου, συγκριτικά με την α' περίοδο της μελέτης, παρουσιάζουν συνολικά μείωση κατά 16% . Η πτώση αυτή θεωρητικά αποδίδεται στη βελτίωση των μέτρων που εφαρμόστηκαν από τις δημόσιες υπηρεσίες υγείας τα τελευταία χρόνια. Η κορύφωσή τους στην Κρήτη το έτος 2001 και η μετέπειτα σταδιακή κάμψη, φαίνεται ότι είναι παράλληλη με την εξέλιξη του μεταναστευτικού κύματος στην Ελλάδα, το οποίο κορυφώθηκε την περίοδο του έτος 2000 (**πίνακας 1**). Πιθανότατα η μετανάστευση έχει παίξει ρόλο στην εικόνα αυτή. Οι έλληνες ασθενείς αποτελούν το 73,3% του συνολικού αριθμού ενώ οι μετανάστες αποτελούν το 26,3% σε πληθυσμό της Κρήτης 601,159 κατοίκων και νόμιμα δηλωμένων μεταναστών 29,664 (5%). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται λόγω της αυξημένης μετανάστευσης ατόμων από χώρες με υψηλή επίπτωση της φυματίωσης, όπως το 85,1% των μεταναστών με TB προέρχονταν από την Ανατολική Ευρώπη, 17,8% από την Πρώην Σοβιετική Ένωση, και 6,4% από την Ασία. Παρότι η αντιστοιχία είναι σε βάρος των μεταναστών, οι Έλληνες ασθενείς υπερέχουν ποσοτικά, ενώ στις αναπτυγμένες χώρες τα υψηλότερα ποσοστά TB ασθενών αφορούν αποκλειστικά τους μετανάστες και όχι το γηγενή πληθυσμό. Συμπερασματικά η δυσκολία οργανωμένης προσέγγισης και ελέγχου ειδικά των παράνομων μεταναστών από τις υπηρεσίες υγείας της Κρήτης, συγκριτικά με τους Έλληνες διαμορφώνει το αποτέλεσμα αυτό. Σημειώνεται η προοδευτική κάμψη στους Έλληνες (-23,5%) και



αντίθετα η αύξηση στους μετανάστες (+7,3%) (πίνακας 6). Παρότι καταγράφηκε αύξηση των κρουσμάτων των αλλοδαπών ως απόλυτος αριθμός, η συσχέτιση των κρουσμάτων με τον αριθμό δειγμάτων τους που εξετάστηκαν, παρουσιάζει μείωση από 12,2% σε 6,4% λόγω της αυξημένης προσέλευσης αλλοδαπών ασθενών. Από το αποτέλεσμα αυτό γίνεται φανερό ότι η αύξηση των κρουσμάτων στους αλλοδαπούς εξηγείται με την συνεχώς αυξανόμενη αθρόα προσέλευση τους στη χώρα και κατ'επέκταση στο νοσοκομείο. (πίνακας 7) Αξιοσημείωτη είναι η μείωση των περιπτώσεων στο 5,6% (πίνακας 1) κατά το έτος 2004, χρονιά των Ολυμπιακών αγώνων, όταν τα μέτρα δημόσιας υγείας ήταν αρκετά βελτιωμένα. Αμέσως μετά παρατηρείται στην Κρήτη αύξηση TB περιπτώσεων σε σύγκριση με το 2004, η οποία αντιστοιχεί σε αυξανόμενο ρεύμα μεταναστών. Στην παρούσα μελέτη υπογραμμίζεται η συγκέντρωση της φυματίωσης αφενός στους αλλοδαπούς και αφετέρου στον ευπαθή Ελληνικό πληθυσμό όπως ηλικιωμένοι, ασθενείς με χρόνιες παθήσεις και ιδιαίτερα άτομα που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (anti-TNF αγωγή και άλλα). Δύο από τους ασθενείς με TB έπασχαν από HIV 2/179 (1,1%) ενώ τρεις από τους ασθενείς 3/179 (1,7%) κατέληξαν. Χαρακτηριστικό ήταν το μορφωτικό επίπεδο των ασθενών με TB: βασική εκπαίδευση είχαν το 61,8%, μεσαία το 27,9% και ανώτατη το 10,3%. Η ηλικιακή κατανομή των ασθενών με TB ήταν χαρακτηριστική και με διαφορές στους δύο εξεταζόμενους πληθυσμούς. Το 35% των Ελλήνων ασθενών ήταν  $\leq$  65 ετών και μόνο το 1,5% ήταν ηλικίας 1-14 ετών, ενώ το 76,6% των μεταναστών ανήκαν στις πιο παραγωγικές ηλικίες των 15-44 ετών και το 12,76% στις ηλικίες 1-14 ετών.

Για τη ταχύτερη διάγνωση των μυκοβακτηριδιώσεων (10,3 ημέρες νωρίτερα), η καλλιέργεια σε υγρά θρεπτικά υγρά είναι επιβεβλημένη, αλλά πάντα πρέπει να

συνοδεύεται και από στερεά καλλιέργεια για την όσο γίνεται μεγαλύτερη πιθανότητα απομόνωσής των μυκοβακτηριδίων. Η κλασική, φαινοτυπική μέθοδος ταυτοποίησης του *M. tuberculosis* με θετικές τις δοκιμασίες παραγωγής νιασίνης, αναγωγής νιτρικών και ανάπτυξης στο υλικό T<sub>2</sub>CH, διακρίνει το *M. tuberculosis* από τα άλλα μυκοβακτηρίδια, αλλά είναι χρονοβόρες και χρειάζονται μεγάλη ποσότητα αποικιών. Αντίστοιχα, η άριστη απόδοση των εμπορικών μοριακών τεχνικών ταυτοποίησης που εφαρμόστηκαν βασίζεται στην ταχύτητα λήψης των αποτελεσμάτων και από τη σωστή ταυτοποίησή τους. Οι μέθοδοι αυτοί έχουν αξιολογηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία και αντικαθιστούν στην καθημερινή πράξη τη κλασική φαινοτυπική ταυτοποίηση. (93,94,100) Βέβαια, θα εξακολουθούν να εφαρμόζονται ως συμπληρωματικές των μοριακών τεχνικών όπου ενδείκνυται.

Το γεγονός ότι οι κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές ανίχνευσης σε κλινικά δείγματα είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες, οδήγησε τα τελευταία 15 χρόνια στην εφαρμογή διαφόρων μοριακών τεχνικών για την γρήγορη διάγνωση και ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών. (18,43,73,95,111,177,183) Η ευαισθησία των διάφορων μεθόδων ανίχνευσης μυκοβακτηριδίων στο κλινικό δείγμα εξαρτάται ευθέως από τον αριθμό των μυκοβακτηριδίων σε αυτό. Για ένα θετικό αποτέλεσμα με την οξεάντοχη χρώση Z-N απαιτούνται τουλάχιστον 10<sup>4</sup> βάκιλοι, για την καλλιέργεια 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> και θεωρητικά ένας βάκιλος ανά ml για την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Με στόχο όσο το δυνατόν ταχύτερη ανίχνευση των μυκοβακτηριδίων από κλινικό δείγμα, με τη παρούσα μελέτη δοκιμάστηκαν οι τρεις εμπορευματοποιημένες μεθοδολογίες γονιδιακού πολλαπλασιασμού (Nucleic Acid Amplification, NAA). Παρατηρήθηκαν διαφορές στα αποτελέσματα των τριών μεθόδων, σε σχέση με τα δείγματα του αναπνευστικού και τα

έξω-πνευμονικά δείγματα. Για τα δείγματα του αναπνευστικού, οι ευαισθησίες με τη μέθοδο Gen-probe AMTD, GenoType Direct και MTBDRPlus βρέθηκαν 88,1%, 95,6%, και 94,6% αντίστοιχα. Σε σχέση με τα εξωπνευμονικά δείγματα, η μέθοδος Gen-probe AMTD είχε ευαισθησία 84,6%, ενώ οι άλλες δύο μέθοδοι της Genotype Direct και MTBDRPlus είχαν 91,6%, μεγαλύτερη από τη AMTD. Υπογραμμίζεται η ικανότητα της μεθόδου GenoType Direct να ανιχνεύει εκτός από το *M. Tuberculosis* και τα πιο σημαντικά άτυπα μυκοβακτηρίδια, όπως τα *M. avium* και *M. intracellulare* όπως διαπιστώθηκε στην έρευνά μας. Εάν αφαιρέσουμε τα άτυπα μυκοβακτηρίδια που ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο GenoType Direct στα αναπνευστικά δείγματα, η ευαισθησία της μεθόδου για το *M. tuberculosis* μειώνεται στο 90,8%, σχεδόν ίδια με τη μέθοδο Gen-probe AMTD. Παρόμοια κατάσταση παρατηρείται και στα έξωπνευμονικά δείγματα, αποκλειστικά μόνο για το *M. tuberculosis*, οι ευαισθησίες των μεθόδων AMTD και GenoType Direct βρέθηκαν ίδιες (84,6%) και μεγαλύτερη για τη μέθοδο MTBDRPlus (91,6%). Οι ειδικότητα και των τριών μεθόδων βρέθηκε 100%. Η μέθοδος Gen-probe AMTD ήταν ευκολότερη στην εκτέλεση, ταχύτερη και φθηνότερη, η μέθοδος GenoType Direct ήταν δυσκολότερη στην εκτέλεση, ιδικά στην εξαγωγή του DNA με μαγνητικά σφαιρίδια, αλλά είχε τη δυνατότητα να ανίχνευση ταυτόχρονα με το *M. tuberculosis* και άτυπα μυκοβακτηρίδια, και η τρίτη μέθοδος GenoType MTBDRPlus είχε τη δυνατότητα ταυτόχρονα με την ανίχνευση του *M. tuberculosis*, να ανίχνευση και τους σημαντικότερους γόνους αντοχής στα πρωτεύοντα αντιφυματικά φάρμακα INH και RMP. Λόγο του μεγάλου κόστους, η επιλογή της συγκεκριμένης τεχνικής γίνεται βάση των κλινικών συμπτωμάτων. Το ιδανικότερο για τη διάγνωση, θα ήταν ο συνδυασμός των δύο τεχνικών GenoType, πρώτα η Direct, για την ανίχνευση των βασικότερων

μυκοβακτηριδίων και εάν το *M. tuberculosis* ανιχνευθεί, να γίνεται και η MTBDRPlus για να ελεγχθούν οι βασικότεροι γόννοι αντοχών.

Για όλα τα 179 στελέχη, το αντιβιογράμμα με τις μεθόδους αναλογιών ολοκληρώθηκε, για μεν το κλασικό με τα σωληνάρια L-J, σε 21 ημέρες τουλάχιστον ( το πρώτο διάβασμα), ή με το αυτοματοποιημένο σύστημα υγρών καλλιεργείων MB/BacT AlerT 3D σε 7 ημέρες. Αναφορικά με τα INH- και RMP-ανθεκτικά στελέχη, μετά την θετικοποίησή των καλλιεργητικών υλικών εφαρμόσθηκε η δοκιμασία GenoType MTBDRPlus με άριστα αποτελέσματα. Ο επικρατέστερος μηχανισμός αντοχής ως προς την INH στην περιοχή μας είναι η μετάλλαξη στο κωδικόνιο 315 του γονιδίου *katG*. Η δοκιμασία GenoType MTBDRPlus προσδιόρισε τους υποκείμενους μηχανισμούς αντοχής σε όλες πλην μιας περιπτώσεως. Στη μελέτη η ειδικότητα και η ευαισθησία για τη RMP ήταν 100%, αλλά και στη διεθνή βιβλιογραφία τα αποτελέσματα είναι ανάλογα υψηλά ( □95%), ενώ για την INH η ευαισθησία βρέθηκε 93,3% και η ειδικότητα 99,3% με τιμές να κυμαίνονται από 70% έως 96% ανάλογα με τη περιοχή σε άλλες μελέτες. Η κλινική χρησιμότητα της εξέτασης είναι αξιόλογη για την τροποποίηση της θεραπευτικής αγωγής του ασθενούς και του περιβάλλον του, για αυτό συνιστάται η εφαρμογή της από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Επίσης, εφαρμόσθηκε σε όλα τα στελέχη Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης η καινούργια μοριακή μεθοδολογία GenoType MTBDRsl για ανίχνευση γόνου αντοχής στις φλουοροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες και EMB. Δεν βρέθηκε κανένα στέλεχος με μεταλλάξεις στους γόνους αντοχής *gyrA* και *rrs*, ακόμα και στο πολυανθεκτικό στέλεχος ή στα ανθεκτικά στις πρώτης-γραμμής αντιφυματικά φάρμακα. Όσον αφορά την αντοχή στην EMB, βρέθηκε μόνο το πολυανθεκτικό στέλεχος να έχει μετάλλαξη στο γονίδιο *embB* (κωδικόνιο 306:

ATG→ATA), το οποίο είχε αντοχή και στην EMB (5μg/ml). Από τα υπόλοιπα 12 ανθεκτικά στην EMB στελέχη, τέσσερα παρουσίασαν αντοχή σε κριτική συγκέντρωση 5μg/ml, δύο σε 3μg/ml και έξι σε 2μg/ml. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα χαμηλά επίπεδα αντοχής των στελεχών μας στην EMB. Οι μεταλλάξεις στο υπεύθυνο για την αντοχή στην EMB γονίδιο (*embB*,306) συνδέονται με κριτικές συγκεντρώσεις EMB  $\square$  20μg/ml. Επίσης, τέσσερα από τα ανθεκτικά στελέχη στην EMB, σε συγκεντρώσεις 5μg/ml, ήχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG*, υπεύθυνο υψηλής αντοχής στην INH. Επομένως, η μοριακή τεχνική MTBDR*sl* συνιστάται για εφαρμογή μετά από θετικά αποτελέσματα για ανίχνευση γόνου αντοχής στη RMP και INH, με τη μοριακή τεχνική MTBDR*Plus*. Βέβαια, ο έλεγχος της ευαισθησίας με τους κλασικούς μεθόδους των αναλογιών παραμένει επιβεβλημένος για την αναγνώριση ψευδούς αποτελέσματος ευαισθησίας, αλλά και για τον έλεγχο στα υπόλοιπα αντιφυματικά φάρμακα καθώς οι μοριακές τεχνικές αδυνατούν να προσδιορίσουν 100% τις αντοχές στα αντιφυματικά φάρμακα.

Η μελέτη των φαινοτύπων αντοχής, ξεχωριστά για τους Έλληνες και μετανάστες (19/132 vs. 14/47), καταδεικνύει την αρκετά μεγαλύτερη αναλογία αριθμού φαινοτύπων εις βάρος των μεταναστών, καθώς και το μοναδικό πολυανθεκτικό στέλεχος MDR άνηκε σε μετανάστη από τη Ρουμανία. **(πίνακας 15)** Αντοχή στην INH βρέθηκε σε 9 από τους 14 φαινοτύπους αντοχής, συγκρίνοντας τις δύο ομάδες πληθυσμού, διαπιστώθηκε τάση αύξησης της αντοχής στους μετανάστες 8/47 (17%), ενώ για τους Έλληνες βρέθηκαν 7/132 (5,3%). Η αύξηση της αντοχής στην INH από 2,9% κατά την α' περίοδο της μελέτης σε 16% κατά τη β' περιόδου είναι αποτέλεσμα της μη εφαρμογής της άμεσα επιβλεπόμενης θεραπείας. Αναφορικά με την συνολική ανθεκτικότητα στα πρώτης

γραμμής αντιφυματικά φάρμακα και την πολυανθεκτικότητα, αυτές κυμαίνονται σε ικανοποιητικά επίπεδα σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες χώρες και με τα αποτελέσματα του νοσ. Θώρακος Σωτηρία. (πίνακας 16). Η αντοχή στην INH 8,4% στη μελέτη είναι σχεδόν ίδια 8,2% με την αντοχή στην INH που έχει ανακοινωθεί από το νοσ.Σωτηρία και μεγαλύτερη συγκριτικά με την Δυτική Ευρώπη, σύμφωνα με στοιχεία του Euro TB 2004 (Αγγλία 6,9%, Ισπανία 6,8%, Γερμανία 7,9%). Σε υψηλά επίπεδα κυμαίνεται στην Κρήτη η αντοχή στη Στρεπτομυκίνη 8,9%, η οποία εξηγείται λόγω της μεγάλης ηλικίας των Ελλήνων ασθενών, οι οποίοι στα νιάτα τους πιθανόν να ελάμβαναν ως θεραπεία Στρεπτομυκίνη. Καλύτερα είναι τα αποτελέσματα ανθεκτικότητας σε RMP και MDR στην Κρήτη (0,56% και 0,56% αντίστοιχα), συγκριτικά με τα στοιχεία του νοσ. Θώρακος Σωτηρία (4,1% και 3,2%), της Αγγλίας (2,2% και 0,6%), της Ισπανίας (1% και 1%), της Γερμανίας (1,6% και 1,3%) αντίστοιχα. Η μελέτη όμως της ανθεκτικότητας, ξεχωριστά στους Έλληνες και μετανάστες, ειδικά για τα πρωτεύοντα αντιφυματικά φάρμακα INH, RMP και Πόλυανθεκτικότητα καταδεικνύει μεγαλύτερη αύξηση στους μετανάστες (πίνακας 17).

Το αποτέλεσμα αυτό κάνει επιτακτική την ανάγκη εφαρμογής της Επιβλεπόμενης Χορήγησης Αντιφυματικού Φάρμακου (Daily Observed Therapy System-DOTS). Επίσης, η εξέλιξη της ανθεκτικότητας στα αντιφυματικά φάρμακα (πίνακας 16), παρότι έχει μειωθεί ο συνολικός αριθμός βακτηριολογικά τεκμηριωμένων περιπτώσεων στη β-περίοδο, είναι ανοδική. Ειδική προσοχή επιβάλλεται στις ομάδες υψηλού κινδύνου όπως οι ηλικιωμένοι, ανοσοκατασταλαμένοι, χρόνιοι πάσχοντες διότι είναι επιρρεπείς τόσο σε άστοχη διάγνωση TB όσο και σε κατάληξη. Συμπερασματικά χρειάζεται:

- Ενιαίο αντιφυματικό πρόγραμμα για την Κρήτη.

- Μέτρα ελέγχου μεταναστών νόμιμων και μη, κατά την αρχή και στη συνέχεια της παραμονής τους.
- Εφαρμογή του συστήματος DOTS στα Κέντρα υγείας.
- Προληπτικός έλεγχος για λανθάνουσα και ενεργό φυματίωση προ-, κατά- και μετά- έναρξης της αντί-TNF αγωγής.

Γενικά οι αναφερόμενες συχνότητες μόλυνσης και νόσησης από μη-φυματιώδη μυκοβακτηρίδια, είναι υποτιμημένες. Αυξανόμενες συχνότητες παρατηρούνται με ταυτόχρονη μείωση της φυματίωσης. Στην περιοχή μας, τα άτυπα μυκοβακτηρίδια αποτελούν το 44% (141/320) των μυκοβακτηριακών απομονώσεων. Μεταξύ των άτυπων, το πλέον συχνά απομονωμένο βρέθηκε το *M. gordonae*, 20,5% (29/141) αλλά μόνο ένα στέλεχος του συνδέθηκε με λοίμωξη. Το πιο παθογόνο βρέθηκε το *M. avium*, 50% όλων των περιπτώσεων και με τη μικρότερη σε ηλικία (17,3 ετών) ομάδα ασθενών. Ακολουθούν το *M. kansasii* και *M. fortuitum* με 10% (4/40) συμμετοχή το καθένα όπως αναφέρεται και σε άλλες μελέτες. Τα Ταχέως αναπτυσσόμενα παρουσίασαν 7 είδη σε ποσοστό 36,2% (51/141) ενώ τα Βραδέως αναπτυσσόμενα διαχωρίστηκαν σε 12 είδη σε ποσοστό 63,8% (91/141). Μόνο το 28,36% (40/141) από τα άτυπα μυκοβακτηρίδια πληρούσε τα κριτήρια για να στοιχειοθετηθεί λοίμωξη. Από τα 40 παθογόνα άτυπα μυκοβακτηρίδια το 80% (32/40) ήταν Βραδέως αναπτυσσόμενα όπως MAC, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum* και *M. gordonae* (πίνακας 20). Θετική οξεάντοχη χρώση (ZN) βρέθηκε στο 42,5% των δειγμάτων από τα οποία το 52,9% ήταν λεμφαδένες υπογραμμίζοντας την αξία της άμεσης χρώσης και στα δείγματα με άτυπα μυκοβακτηρίδια.

Αναγνώριση της αυξανόμενης σπουδαιότητας των νοσημάτων από μη-φυματιώδη μυκοβακτηρίδια στην Κρήτη συνδέεται με την αύξηση της απομόνωσής τους και αποδίδεται στην αύξηση του αριθμού των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, αλλά και στη βελτίωση των καλλιεργητικών τεχνικών. Η διάκριση μεταξύ αποικισμού και νόσο από αυτά τα μυκοβακτηρίδια δεν είναι εύκολη και η αξιολόγηση γίνεται με βάση τα αντίστοιχα κριτήρια. Παράγοντες κινδύνου αναφέρθηκαν με πρώτο το κάπνισμα 7/40, ακολουθεί η ΧΑΠ 5/40, η Ρευματοειδής αρθρίτιδα 4/40, η παλαιά TB-3/40 (**πίνακας 20**)

Σύγκριση επιδημιολογικών δεδομένων μεταξύ TB και λοιμώξεις από άτυπα μυκοβακτηρίδια παρουσιάζεται στον **πίνακα 26**.

**Πίνακας 26. Σύγκριση επιδημιολογικών δεδομένων μεταξύ TB και λοιμώξεις από Άτυπα μυκοβακτηρίδια.**

<b>ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</b>	<b>M.tuberculosis</b>	<b>άτυπα μυκοβακτηρίδια</b>
<b>Ηλικία</b>	45,4 ετών	40,3 ετών
<b>Φύλο: Α/Γ</b>	128/51, λόγος→2,5	18/22, λόγος→0,82
<b>Έλληνες/Αλλοδαποί</b>	73,4% / 26,6%	77,5% / 22,5%
<b>Παράγοντες κινδύνου: 1.</b>	Κάπνισμα 41%	Κάπνισμα 17,5%
<b>2.</b>	Ανοσοκαταστολή 13,7%	ΧΑΠ 12,5%
<b>3.</b>	Αλκοόλ 13,7%	Ρευματ. Αρθρ. 10%
<b>4.</b>	Σακχ.διαβίτης 8,8%	Παλαιά TB 7,5%
<b>Θετική χρώση Z-N</b>	60,9%	42,5%
<b>Εντόπιση:</b>		
<b>Πνευμονική</b>	80%	52,5%
<b>Έξωπνευμονική</b>	20%	47,5%



Αξιοσημείωτο είναι το νεαρό της ηλικίας όχι μόνο των ασθενών με TB αλλά και με μυκοβακτηριδίαση. Οι άνδρες υπερέχουν σημαντικά έναντι των γυναικών στη φυματίωση, ενώ αντιθέτως στις λοιμώξεις με άτυπα υπερέχουν οι γυναίκες. Οι αλλοδαποί συμμετείχαν με το ίδιο σχεδόν ποσοστό και στις δύο ομάδες λοιμώξεων. Υπογραμμίζεται ως πρώτος παράγοντας κινδύνου και στις ομάδες ασθενών βρέθηκε το κάπνισμα. Η θετική χρώση Z-N έχει μεγαλύτερη ευαισθησία για τα δείγματα με TB και λιγότερη για τα δείγματα με άτυπα μυκοβακτηρίδια χωρίς να μειώνεται η χρησιμότητά της και για αυτά τα δείγματα. Μεγάλη διαφορά υπήρξε στην εντόπιση της νόσου με TB (80% πνευμονική) και της νόσου με άτυπα μυκοβακτηρίδια (52,5% πνευμονική). Συνεπώς η αναζήτηση των άτυπων μυκοβακτηριδίων επιβάλλεται να γίνεται σε όλα τα είδη δειγμάτων. Κατά τη διάρκεια της μελέτης απομονώθηκαν και τυποποιήθηκαν σπάνια και καινούργια είδη μυκοβακτηριδίων. Για πρώτη φορά στην Ευρώπη και για έβδομη φορά παγκοσμίως απομονώθηκε το σκοτοχρωμογόνο *M. thermoresistibile* από κλινικό δείγμα. Οι προηγούμενες περιπτώσεις με *M. thermoresistibile* σχετίστηκαν είτε με πνευμονικές είτε με δερματικές λοιμώξεις. Παρότι θεωρείται παθογόνο, σπάνια απομονώνεται από κλινικά δείγματα, πιθανόν λόγω τις δυσμενείς καλλιεργητικές συνθήκες (θερμοκρασία  $\leq 40^{\circ}\text{C}$ ), που απαιτούνται. Επιπλέον, είναι δύσκολος ο φαινοτυπικός διαχωρισμός του από τα άλλα συγγενικά του μυκοβακτηρίδια όπως *M. phlei* και *M. flavescens* και γονοτυπικά δεν συμπεριλαμβάνεται στις έτοιμες (εμπορικές) μεθοδολογίες. Ένα από τα σπουδαιότερα προβλήματα σχετικά με τα άτυπα μυκοβακτηρίδια είναι εάν η απομόνωσή τους από τα κλινικά δείγματα σημαίνει αποικισμός ή λοίμωξη. Η απόφαση επαφίεται αποκλειστικά στις οδηγίες της Αμερικανικής Θωρακικής Εταιρίας. Όμως, δεν είναι σαφή η διάκριση μεταξύ αποικισμός

και χαμηλού βαθμού λοίμωξης. Επιπλέον, η έκθεση σε περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια δεν είναι αθώα ειδικά για τους ασθενείς με χρόνια πνευμονική νόσο. Ο Primm (145) υπογραμμίζει ότι η υπερευαίσθητη πνευμονίτις είναι αποτέλεσμα της δράσης των απελευθερωμένων προϊόντων φλεγμονής από μυκοβακτηρίδια, όχι αναγκαστικά στη φάση της λοίμωξης. Ο Griffith (67) αναφέρει ότι σε πνευμονικές παθήσεις με παράλληλη απομόνωση του *M. abscessus* κανονικός αποικισμός δεν υφίσταται και η ελάχιστη νόσος παρουσιάζει ελάχιστα συμπτώματα. Το ταχέως αναπτυσσόμενο μυκοβακτηρίδιο *M. thermoresistible* απομονώνεται σπάνια πιθανών λόγω συνθηκών καλλιέργειας ( $\square 40^{\circ}\text{C}$ ) Από το 1966 έχουν αναφερθεί μόνο 6 περιπτώσεις ανίχνευσης του σε κλινικά δείγματα Στην περίπτωση μας η απομόνωση του *M. thermoresistible* αξιολογήθηκε ως αποικισμός με βάση τα κριτήρια της ΑΘΕ. Η θεραπεία που δόθηκε όμως συμπεριελάμβανε το ciprofloxacin στο οποίο το *M. thermoresistible* ήταν ευαίσθητο με αποτέλεσμα τη κλινική βελτίωση. Λόγο της σχέσης του *M. thermoresistible* με τις πνευμονικές και δερματικές λοιμώξεις, χρειάζεται η επώασή των δειγμάτων αυτών και στους  $42^{\circ}\text{C}$ . Για την ταυτοποίησή του, όπως και για την ταυτοποίηση των υπόλοιπων σπάνιων μυκοβακτηριδίων (*M. europaeum*,) συνιστούνται οι μοριακές τεχνικές όπως προσδιορισμός αλληλουχιών (sequencing) και ανάλυση PCR-RFLP. (34,125,173,190). Τα χρωμογόνα ταχέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια, όπως το απομονωμένο για τρίτη φορά παγκοσμίως, *M. europaeum*, δεν προκαλούν νόσο, παρομοίως και στην περίπτωση μας. Ένα καινούργιο στέλεχος άτυπου μυκοβακτηριδίου απομονώθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριό μας από δείγματα δώδεκα ασθενών του νοσοκομείου μας. Τα φαινοτυπικά του χαρακτηριστικά το διακρίνουν από τα ταχέως αναπτυσσόμενα (πίνακας 22) καθώς και από τα βραδέως αναπτυσσόμενα *M. terrae complex* (*M. terrae*, *M.*

*nonchromogenicum*, *M. triviale*, *M. hiberniae*), *M. arupense*, *M. kumanotonense*, *M. senuense* (πίνακας 23). Το λιπιδικό προφίλ των νέων στελεχών με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ήταν πανομοιότυπο, με χαρακτηριστική την ύπαρξη δύο διαφορετικών συμπλεγμάτων από κορφές: το μεγάλο σύμπλεγμα συμπεριλαμβάνει τέσσερις μεγάλες κορφές μεταξύ 5 $\mu$  και 6 $\mu$  και το δεύτερο, μετά από διάστημα 2 λεπτών, παρουσιάζει τρεις μικρές κορφές (εικ.9). Η σύγκριση του χρωματογράμματος με αυτά της βάσης δεδομένων των μυκοβακτηριδιακών χρωματογραμμάτων, έδειξε σχετικότητα με το προφίλ των ειδών του *M. terrae* complex, με πλησιέστερη ομοιότητα, αυτή του *M. nonchromogenicum* (εικ.9). Με την μοριακή τεχνική GenoType διαφοροποιήθηκαν αρκετά μυκοβακτηρίδια (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis* και άλλα), αλλά όχι αυτά του συμπλέγματος *M. terrae* complex. Η αλληλουχία του γονιδίου 16SrRNA των στελεχών συγκρίθηκε με άλλες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank. Η σύγκριση απέδειξε 100% ομοιότητα (454/454) με το 16SrRNA του *Mycobacterium* spp. FI-05158, 99% ομοιότητα με το *M.sp* N1740C, 99% ομοιότητα με το *M. arupense*, *M. nonchromogenicum*, *M. europaeum*. Η σύγκριση με βάση δεδομένων RIDOM παρουσίασε τις ακόλουθες ομοιότητες: *M. terrae* (98,65%), *M. nonchromogenicum* (98,42%) και *M. hiberniae* (97,52%). Επίσης, η μερική αλληλουχία του γονιδίου *hsp65* του νέου στελέχους, συγκρίθηκε με άλλες δημοσιευμένες αλληλουχίες μυκοβακτηριδίων στη βάση δεδομένων GenBank. Οι πιο κοντινές ομοιότητες παρουσιάστηκαν με το *M. nonchromogenicum* 392/401 (97%), *M. hiberniae* 388/401 (96%), *M. engebaekii* (95%), *M. arupense* (94%) και μερικά είδη *M. terrae*. Η απόκλιση  $\approx$ 3% στην αλληλουχία με όλα τα υπόλοιπα μυκοβακτηρίδια, παρουσιάζει το νέο στέλεχος *Mycobacterium* sp GN<sub>01</sub> ως μη-αναφερόμενο είδος. Αναλύοντας το

δενδρόγραμμα βάση του 16SrRNA, (εικ.10) παρατηρείται ότι τα κοντινότερα είδη στο νέο στέλεχος είναι το *M. arupense* και το *M. nonchromogenicum*.(171) Παρόμοιο αποτέλεσμα συμπεραίνεται και με το δενδρόγραμμα βασισμένο στην αλληλουχία του γονιδίου *hsp65* (εικ.11) με το *M. nonchromogenicum* να είναι το κοντινότερο μυκοβακτηρίδιο στο *Mycobacterium sp GN<sub>01</sub>*. Λόγω της απομόνωσης του *Mycobacterium spp GN<sub>01</sub>* στο εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, το στέλεχος ονομάστηκε ***Mycobacterium herakleense***. Ένα δεύτερο νέο στέλεχος, το βραδέως αναπτυσσόμενο GN-9680, απομονώθηκε στο εργαστήριο και κατατέθηκε στη βάση δεδομένων GenBank, καθώς και σε τράπεζες φύλαξης βακτηριδίων, υπογραμμίζοντας τη προσφορά του εργαστηρίου στη μελέτη των μυκοβακτηριδίων. Η σχετική ομοιότητά του με το *M. intracellulare* το καθιστά υπολογίσιμο στην ταυτοποίησή του. Σπάνια, περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια απομονώθηκαν, όπως το *M. arupense*, (πρώτη απομόνωση και ταυτοποίηση στην Ελλάδα), με το βασικό ερώτημα κατά πόσο προκαλούν λοίμωξη, η παραβρίσκονται ως αποικιστές στα κλινικά δείγματα ασθενών. Επιβάλλεται στο μέλλον να προσδιοριστεί μετά από μελέτες ο ρόλος των Μη-Φυματιωδών Μυκοβακτηριδίων στην παθογένεια των λοιμώξεων.

Η αντιμικροβιακή θεραπεία των άτυπων μυκοβακτηριδίων συμπεριλαμβάνει τις αμινογλυκοσίδες, μακρολίδες, κινολόνες και αντιφυματικές ουσίες ανάλογα με το είδος του μυκοβακτηριδίου.

Τα αποτελέσματα των αντοχών στα φάρμακα για τα Ταχέως αναπτυσσόμενα (πίνακας 24) επιβεβαιώνουν το συμπέρασμα, ότι κάθε στέλεχός τους πρέπει να ελέγχεται ατομικά, εφόσον είναι κλινικά αξιόλογο, για να προσφέρει στον κλινικό θεραπευτικές επιλογές.

Συγκριτικά με άλλες μελέτες, τα αποτελέσματά μας ήταν παρόμοια όσον αφορά τη δράση των αμινογλυκοσιδών, με την αμικασίνη να έχει καλύτερη δράση από τη τομπραμυκίνη, παρότι τη μεγάλη νεφρο- και ώτο-τοξικότητα που έχει, να παραμένει ένα από τα δραστικότερα για αυτά τα μυκοβακτηρίδια. Πολύ καλή απόδοση είχε η κλαρυθρομικίνη σε όλα τα Ταχέως αναπτυσσόμενα Επίσης, επιβεβαιώθηκε η πολύ καλή δράση της σπαρφλοξασίνης και των υπολοίπων κινολονών, με ελάχιστα καλύτερη δράση αυτή της σπαρφλοξασίνης. Η λινεζολίδη και η δοξικυκλίνη παρουσίασαν παρόμοιες ευαισθησίες. Η λινεζολίδη ενώ προσφέρει μια εναλλακτική *per os* θεραπεία, έχει το μειονέκτημα των παρενεργειών της όπως νευροπάθεια και καταστολή του μυελού των οστών. Από τις β-λακτάμες η ιμιπενέμη παρουσίασε την καλύτερη δραστηριότητα για τις ομάδες των *M. fortuitum* και *M. peregrinum*, ενώ για τα *M. chelonae* καμία, σε αντιπαράθεση με άλλες μελέτες που δείχνουν μεγαλύτερη ευαισθησία της ιμιπενέμης για τα *M. chelonae*. Υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για τη δραστηριότητά της ουσίας αμοξ/κλαβ οξύ έναντι των ταχέως αναπτυσσομένων μυκοβακτηριδίων. Η απόδοσή της στην έρευνα μας έδειξε ικανοποιητικά επίπεδα για τις ομάδες των *M. fortuitum* και *M. peregrinum* και καθόλου για τα *M. chelonae* και *M. abscessus*. Η δράση της τιγκεκυκλίνης ήταν αρίστη για τα Ταχέως αναπτυσσόμενα, με εξαίρεση του ενός στελέχους *M. europaeum*, που ήταν αρνητική. Η εισαγωγή της γλυκυλκυκλίνης σηματοδοτεί σημαντική πρόοδο στις τετρακυκλίνες, διότι οι γλυκυλκυκλίνες δεν επηρεάζονται από τους βασικούς γενετικούς μηχανισμούς (ριβωσωματική προστασία, efflux), υπεύθυνοι για την αντοχή στις τετρακυκλίνες μεταξύ των βακτηριδίων. Δεν μπορεί να βγει ασφαλές συμπέρασμα για τις αντοχές των λίγων στελεχών όπως *M. thermoresistibile*, *M. mucogenicum* και *M. europaeum*. Τα αποτελέσματά μας είναι συγκρίσιμα με αυτά άλλων ερευνών.

Οι πιο δραστικές ουσίες, με άριστες ευαισθησίες (100%) έναντι των Βραδέως αναπτυσσομένων (πίνακας 25), βρέθηκαν οι μακρολίδες με εξαίρεση την ομάδα των *M. lentiflavum* και των *M. GN<sub>01</sub>* (η *M. Herakleense*). Οι τρεις κινολόνες που ελέχθησαν έδειξαν παρόμοιες ευαισθησίες, με ελαφρώς καλύτερη αυτή της σπαρφλοξασίνης αλλά γενικά ήταν λιγότερο ευαίσθητες από ότι στα Ταχέως αναπτυσσόμενα. Μηδενική η δράση τους για τα *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. arupense* και *M. herakleense*, ενώ πολύ χαμηλή ήταν για τα *M. avium*. Από τις αντιφυματικές ουσίες η λιγότερο δραστική βρέθηκε η ισονιαζίδη. Η ριφαμπικίνη και η εθαμβουτόλη εμφάνισαν μέτρια ευαισθησία στο σύνολο των Βραδέως αναπτυσσόμενων μυκοβακτηριδίων. Στα *M. kansasii*, *M. gordonae* η δε ριφαμπικίνη παρουσίασε άριστη δράση, ενώ μηδενική για *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. lentiflavum*, όπως έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες. Η νέα αντιβακτηριδιακή ουσία τιγκεκυκλίνη, ενώ έδειξε άριστη δράση έναντι των Ταχέως αναπτυσσομένων, έναντι των Βραδέως αναπτυσσομένων χαμηλή (εκτός των μοναδικών στελεχών *M. malmonse* και *M. xenopi*). Η λινεζολίδη έδειξε διαφορετική δράση με πολύ καλά in-vitro αποτελέσματα για τα *M. kansasii*, *M. malmonse*, *M. scrofulaceum* και μέτρια για τα *M. gordonae*. Λόγο της τοξικότητά του όμως η χρήση του φαρμάκου είναι περιορισμένη. Η δράση της δευτέρας γενιάς αντιφυματικής ουσίας εθουναμίδη από την ομάδα των μη-φυματικών μυκοβακτηριδίων, ποικίλει από μηδενική έως άριστη. Συγκεκριμένα στα Βραδέως αναπτυσσόμενα βρέθηκε ευαισθησία 100% στα *M. avium*, *M. lentiflavum* και στα μοναδικά στελέχη *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. malmonse*, *M. xenopi*. Η τελευταία ουσία που ελέχθη ήταν η τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη η οποία παρουσίασε καλή in-vitro δράση στα *M. avium*, *M. lentiflavum*, όπως και στα μοναδικά στελέχη *M. marinum*, *M. malmonse*, *M. xenopi* δείχνοντας θεραπευτική

επιλογή. -στη δική μας περιοχή, οι φαινότυποι αντοχής έχουν συγκεκριμένο προφίλ, με τα MAC να μην εμφανίζουν αντοχή στις μακρολίδες και τα *M. kansasii* να μην εμφανίζουν αντοχή στη ριφαμπικίνη. Αξιοσημείωτες είναι οι αντοχές στα περιβαλλοντικά, με λιγότερη κλινική σημασία, μυκοβακτηρίδια, όπως τα *M. lentiflavum* (184), *M. arupense*, *M. herakleense*. Στην πράξη, στελέχη που στοιχειοθετούν αιτία λοίμωξης χρίζουν έλεγχο ευαισθησίας σε συγκεκριμένες ομάδες αντιβιοτικών, ανάλογα την κατάταξή τους σε Βραδέως και Ταχέως αναπτυσσόμενα. Οι απολήξεις των διακλαδώσεων της λιποαραμπινομανάνης (LAM) έχουν διαφορετική σύνδεση στα Ταχέως και στα Βραδέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια. Στα βραδέως αναπτυσσόμενα οι απολήξεις αυτές καλύπτονται από καπέλο (μόρια μαννόζης) που σκεπάζει τη βιολογικά δραστικότερη αραμπινόζη η οποία είναι καλύτερα προσαρμοσμένη στην ενδοκυττάρια επιβίωση των μυκοβακτηριδίων. Διαφορετικές ουσίες ελέγχονται και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενίοτε, λόγω της διαφορετικότητας του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ των δύο βασικών ομάδων μυκοβακτηριδίων (διαφορετικές ευαισθησίες των ίδιων φαρμάκων), όπως έδειξε και η έρευνα. Επίσης, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και εντός του ίδιου συμπλέγματος όπως το MAC (μικρές διαφορές μεταξύ *M. avium* και *M. scrofulaceum*, αλλά αρκετά σημαντικότερες αυτών των δύο ομάδων στελεχών, σε σύγκριση με το *M. intracellulare*, με το τελευταίο να είναι το ανθεκτικότερό τους). Κλινικά σημαντικά επίπεδα αντοχής οφείλονται στη συνύπαρξη μηχανισμών αντοχής όπως η προαναφερθείσα μειωμένη διαπερατότητα του τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων, η παραγωγή β-λακταμάσες, η παραγωγή ενζύμων που αδρανοποιούν τις αμινογλυκοσίδες, η ενεργητική απέκκριση των αντιβιοτικών (efflux).

Τα μόρια στόχοι των αντιβιοτικών στα μυκοβακτηρίδια εμφανίζουν μικρότερη συγγένεια σε σύγκριση με εκείνα των κοινών βακτηριδίων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν, ότι η συνεχής βελτίωση των εμπορικών τεχνικών και συγκεκριμένα το αυτοματοποιημένο σύστημα ανίχνευσης και καλλιέργειας, και οι μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης και ελέγχου αντοχής, οδηγούν στην ταχύτατη λήψη έγκαιρων αποτελεσμάτων. Στη ρουτίνα του διαγνωστικού εργαστηρίου, οι μέθοδοι αυτές έχουν ήδη αξιολογηθεί στη βιβλιογραφία και αντικαθιστούν τη συμβατική φαινοτυπική ταυτοποίηση. Η τελευταία δεν είναι μόνο χρονοβόρα, αλλά αδυνατεί να διακρίνει μεταξύ συγκεκριμένων ειδών, να τυποποιήσει ορισμένα είδη και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικτά μικροβιολογικά καλλιεργήματα. Η συνδυασμένη χρήση υγρού και στερεού καλλιεργητικού υλικού είναι απαραίτητη. Οι φαινοτυπικές μέθοδοι ταυτοποίησης θα εξακολουθούν να εφαρμόζονται ως συμπληρωματικές των μοριακών όπου ενδείκνυται.



## ***ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ***

Η παρούσα οκτάχρονη μελέτη ανέδειξε σημαντική αύξηση των περιπτώσεων φυματίωσης μεταξύ των μεταναστών, καθώς και υψηλά επίπεδα αντοχών στα αντιφυματικά φάρμακα. Για τους Έλληνες ασθενείς, οι περιπτώσεις φυματίωσης μειώνονται με παράλληλη αύξηση των αντοχών στα αντιφυματικά φάρμακα. Σημειώθηκε συγκέντρωση της φυματίωσης αφενός σε αλλοδαπούς και αφετέρου σε ευπαθής ομάδες του ελληνικού πληθυσμού όπως ηλικιωμένοι, χρόνια πάσχοντες και ανοσοκατασταλμένοι (κυρίως λαμβάνοντες αντι-TNF). Η αντοχή στην INH 8,4% είναι σχεδόν ίδια με την αντοχή του Κέντρου Αναφοράς Νος. Σωτηρία και μεγαλύτερη συγκριτικά με τη Δυτική Ευρώπη. Σε υψηλά επίπεδα βρέθηκε η αντοχή στη Στρεπτομυκίνη και χαμηλότερα τα επίπεδα αντοχής σε Ριφαμικίνη και η πολυαντοχή (MDR).

Σημαντικό εύρημα αποτέλεσε η αυξανόμενη συχνότητα νοσημάτων από Μη-φυματιώδη μυκοβακτήρια στην Κρήτη που απεδόθη στην αύξηση του αριθμού των ανοσοκατασταλμένων ασθενών όπως και στην βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων. Συνιστάται ως έλεγχος ρουτίνας η αναζήτηση *M. avium* στα κόπρανα των ασθενών με HIV, η αναζήτηση *M. avium* σε κάθε δείγμα με λεμφαδένα, ειδικά σε μικρές ηλικίες. Σε εμπύρετο ανοσοκατασταλμένων ασθενών η καλλιέργεια αίματος για *M. avium* είναι ενδεδειγμένη. Ελάχιστη ήταν η παρουσία δειγμάτων του δέρματος με αποτέλεσμα απομόνωση ενός μόνο στέλεχος *M. marinum* και κανένα άλλο άτυπο. Συνιστάται επίσης καλύτερη συνεργασία με τους δερματολόγους για το θέμα αυτό. Τα αποτελέσματα των

αντοχών στα φάρμακα για τα Ταχέως αναπτυσσόμενα (πίνακας 24) επιβεβαιώνουν το συμπέρασμα ότι κάθε στέλεχος τους πρέπει να ελέγχεται ατομικά, εφόσον είναι κλινικά αξιόλογο, για να προσφέρει στον κλινικό θεραπευτικές επιλογές. Βασικό μειονέκτημα στη διάγνωση της λοίμωξης από μυκοβακτηρίδιο παραμένει η μη ανταπόκριση των κλινικών ιατρών για την αποστολή τριών τουλάχιστον δειγμάτων (πτύελα, ούρα) για κάθε ασθενή όπως και έγκαιρη δειγματοληψία μη δημοφιλών δειγμάτων (δερματικό επίχρισμα, λεμφαδένα, πιο, κόπρανα).

Τα στοιχεία της μελέτης συνεισφέρουν στην απόφαση του Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για την αξιοποίηση των εμπορικών τεχνολογιών ως πρωταρχικό test στην ανίχνευση της ανθεκτικής φυματίωσης. Αναγκαία κρίνεται η αναζήτηση των μεταλλαγμένων γονοδίων κατευθείαν στο δείγμα με μοριακή τεχνική για τον άμεσο προσδιορισμό της αντοχής στα αντιφυματικά φάρμακα. Επίσης, αναγκαίως είναι ο προληπτικός έλεγχος για λανθάνουσα και ενεργό φυματίωση προ-, κατά- και μετά- έναρξης της αντί-TNF αγωγή. Επιβάλλεται η δημιουργία ενιαίο αντιφυματικό πρόγραμμα για την Κρήτη, με μέτρα ελέγχου μεταναστών νομίμων και μη κατά την αρχή και στη συνέχεια της παραμονής τους, με προσοχή στις ομάδες υψηλού κινδύνου όπως οι χρόνιοι πάσχοντες, οι ανοσοκατασταλαμένοι οι ηλικιωμένοι και σύνδεση με εργαστήριο αναφοράς για μυκοβακτηρίδια.

## ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

### ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 1

#### **Διαδικασία της μεθόδου Nalc-NaOH**

Γίνεται αρίθμηση των δειγμάτων και αντίστοιχη αρίθμηση των σωληναρίων Falcon, των σωληναρίων με το στερεό υλικό Lowenstein-Jensen (δύο για κάθε δείγμα), των φιαλιδίων υγρής καλλιέργειας MB/Battler 3D του αυτοματοποιημένου συστήματος, των αντικειμενοφόρων πλακών (δύο για κάθε δείγμα) και σε ένα σωληνάριο erpendorf για PCR.

#### 1) *Δείγματα από αναπνευστικό σύστημα: πτύελα και βρογχικά*

- Προσθέτουμε από το διάλυμα Nalc-NaOH ίση ποσότητα με το δείγμα.
- Vortex για 30 δευτερόλεπτα.
- Αφήνουμε 15' σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά του δείγματος σε σωληνάριο Falcon 50ml
- Συμπληρώνουμε έως 50ml με φωσφορικό buffer PBS.
- Φυγοκέντρωση στις 3000 στροφές για 15'.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο στο δοχείο με αντισηπτικό
- Στο ίζημα προσθέτουμε 2,0ml PBS και ανακινούμε ήρεμα.

#### 2) *Ούρα*

- Φυγοκέντρωση 3000χ για 15'.
- Πετάμε το υπερκείμενο στο ειδικό κουβαδάκι.
- Αραίωση του ιζήματος με 2-5ml αποσταγμένο νερό.

Ακολουθεί η μέθοδος NALC-NAOH

3) *Γαστρικό υγρό*

- Γαστρικό υγρό τοποθετείται σε σωληνάριο τύπου Falcon, με 100mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- Αν το υγρό είναι πυώδες, προστίθεται 50-100mg NALC για 50ml.
- Ανακίνηση και vortex για 15΄΄.
- Φυγοκέντρηση 3000χ για 15΄.
- Πετάμε το υπερκείμενο στο ειδικό κουβαδάκι με αντισηπτικό. Σκουπίζουμε το χείλος με οινόπνευμα.
- Αραίωση του πύργματος με 2-5ml αποσταγμένο νερό.

Ακολουθεί η μέθοδος Nalc-NaOH.

4) *Υγρά (Πλευριτικά, Ασκητικά, Περικαρδικά)*

- Σε αυτά που έχουν ινική προστίθεται αντιπηκτική ουσία.
- Φυγοκέντρηση, για ποσότητες πάνω από 10ml, 3000χ για 15΄.
- Πετάμε το υπερκείμενο σε ειδικό κουβαδάκι με αντισηπτικό και στρώνουμε το ίζημα.

5) *Στειλεοί*

- Προσθέτουμε 2ml αποσταγμένο νερό σε αποστειρωμένο σωληνάριο.
- Μεταφέρουμε το στείλεό στο σωληνάριο και το στραγγίζουμε καλά.
- Για επιμολυσμένα δείγματα ακολουθεί η μέθοδος Nalc-NaOH.

6) *Βιοψίες*

- Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένοι τρίφτες (Potter) μεγάλοι και μικροί. Τα μεγάλα κομμάτια κόβονται με αποστειρωμένα μαχαίρια
- Προσθέτουμε 2-3ml 7H9 Middlebrook broth στο τρίφτη.

- Για επιμολυσμένα δείγματα ακολουθεί η μέθοδος Nalc-NaOH.

#### 7) Αίμα και Μυελό

- 5ml αίμα υπό άσηπτες συνθήκες μεταφέρεται στην ειδική μαύρη φιάλη MB/BactAlert 3D για επώαση.

#### ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

- Απολυμαίνουμε το πόμα των φιαλιδίων MB/BacT.
- Προσθέτουμε σε κάθε φιαλίδιο 0,5 ml από το ανασυσταθέν μείγμα αντιβιοτικών.βλ. πρωτόκολλο για το σύστημα MB/BacT.
- Παίρνουμε το ίζημα με σύριγγα και εμβολιάζουμε ως ακολούθως:
  - 0,5ml στο φιαλίδιο MB/BacT
  - 0.2ml στα δύο σωληνάρια με Lowenstein-Jensen.
  - Με κρίκο τοποθετούμε ίζημα στις δύο αντικειμενοφόρες πλάκες
  - Το υπόλοιπο στο σωληνάριο erpendorf για την PCR.

#### ΕΠΩΑΣΗ

- Το ένα από τα δύο σωληνάρια Lowenstein-Jensen επωάζεται στους 37° για 2-3 μήνες. Για 6 ημέρες το καπάκι του μένει χαλαρό για να εξατμισθεί το υγρό.
- Το δεύτερο από τα σωληνάρια Lowenstein-Jensen επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το φιαλίδιο με την υγρή καλλιέργεια μπαίνει στον ειδικό κλίβανο για 42 ημέρες. Όταν η καλλιέργεια θετικοποιηθεί, γίνεται ανακαλλιέργεια με σύριγγα μετά από σχολαστικό καθαρισμό του πόματος με αντισηπτικό.(BBL MycoPrep Mycobacterium Specimen Digestion/Decontamination Kit, Becton Dickinson).

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 2

### **Μικροσκοπική εξέταση. Οξεάντοχη χρώση βακτηριδίων.**

Η χρωστική φαινικούχος φουξίνη παρασκευάζεται με την ανάμιξη της φουξίνης και του αντισηπτικού φαινόλης. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι η «εν ψυχρώ» τεχνική Kinyun.

- Μονιμοποίηση του ιζήματος στην αντικειμενοφόρα πλάκα με οινόπνευμα. Τα πλακάκια στεγνώνουν είτε στον αέρα, είτε πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα.
- 5' επώαση με τη χρωστική φαινικούχος φουξίνη.
- Ξέπλυμα με οξιμισμένο οινόπνευμα (3ml con.HCl + 97ml αιθανόλη 90-95%).
- 10' επώαση με τη χρωστική κυανού του μεθυλενίου.
- Προσεκτικό ξέπλυμα με νερό και στέγνωμα.
- Εξετάζουμε στο μικροσκόπιο με φακό 100X και λάδι.(Kinyun και Gabett solutions, BioMerieux)

### **ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΕΩΣ**

<i>Αριθμός μωκοβ. Κατά οπτικό πεδίο</i>	<i>Απάντηση</i>
0	Αρνητική (-)
1-2 / 300κ. κ.ο.π.	(±)
1-9 / 100 κ.ο.π.	Θετική (1+)
1-9 / 10 κ.ο.π.	Θετική (2+)
1-9 σε κάθε κ. ο.π.	Θετική (3+)
> 9 σε κάθε κ.ο.π.	Θετική (4+)

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 3

### **Σύστημα καλλιέργειας MB/BacT Alert 3D**

#### *Αρχή της μεθόδου*

Το MB/BacT Alert 3D, Mycobacterium Detection System χρησιμοποιεί χρωματομετρικό δείκτη και αντανάκλαση φωτός στο μόνιτορ για την παρουσία και παραγωγή CO<sub>2</sub> ως προϊόν του μεταβολισμού τους. Το χρώμα στον πυθμένα της φιάλης αλλάζει από σκούρο πράσινο σε ανοιχτό πράσινο και κίτρινο λόγω του χρωματομετρικού δείκτη ευαισθησίας στο αέριο.

Όπως βλέπουμε και στον παρακάτω πίνακα θετική προκαταρκτική απάντηση δίνεται μόνον εφόσον η χρώση ZN από το υλικό της θετικής φιάλης έχει δώσει θετικό αποτέλεσμα.

ΣΗΜΑ(+) ZN(+) Θετική προκαταρκτική απάντηση. Έπεται ταυτοποίηση.

ΣΗΜΑ(+) ZN(-) Καμία απάντηση. Αδυναμία εξακρίβωσης παρουσίας ή απουσίας μυκοβακτηριδίων. Αναμονή επώασης των L-J.

#### *Περιορισμοί της μεθόδου:*

1) Η παρουσία και ενός μόνο άλλου βακτηριδίου μπορεί να προκαλέσει επιμόλυνση των καλλιιεργειών.

2) Εάν συμβεί στη φιάλη να αναπτυχθούν και κοινά βακτηρίδια, το μηχάνημα θα σημάνει γρηγορότερα, καθώς η ανάπτυξη των κοινών βακτηριδίων είναι ταχύτερη. Σ' αυτήν την περίπτωση απαιτείται να γίνουν συμπληρωματικές εργασίες, (καλλιέργειες, ταυτοποιήσεις κλ.)

3) Φιάλες θετικές ή με θολερότητα θα πρέπει να καλλιεργούνται τόσο για μυκοβακτηρίδια σε L-J, όσο και για κοινά βακτήρια σε Αιμ., Mc, και άλλα.

4) Ιστοί που δύσκολα ενοφθαλμίζονται στις φιάλες με τις σύνηθες σύριγγες, θα πρέπει να κονιορτοποιούνται και να εισάγονται με βελόνες μεγαλύτερου αυλού.

5) Επί υποψίας *M. malmonse*, ή *M. genovense* απαιτείται επιπλέον ημέρες επώασης.

6) Σε σπάνιες περιπτώσεις, μυκοβακτηρίδια που αναπτύσσονται, δεν παράγουν αρκετό CO<sub>2</sub> για να αξιολογηθούν ως θετικές. Παραδείγματος χάριν όταν ο ασθενής βρίσκεται υπό αντιφυματική αγωγή.

7) Καλλιέργειες που ελήφθησαν μετά από την έναρξη της αντιφυματικής θεραπείας μπορεί να δώσουν αρνητικό αποτέλεσμα.

8) Το Antibiotic Supplement, παρότι αναγκαίο, μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων.

#### *Διαδικασία*

Οι φιάλες για το μηχάνημα συντηρούνται στο ψυγείο. Μισή ως μία ώρα πριν τη χρήση αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου. Περιέχουν ουσίες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη μυκοβακτηριδίου όπως 10 ml 7H9 Middlebrook broth, casein, bovine serum albumin, catalase, απεστ. νερό. Ονομάζονται MB/BacT Process Bottle. Συμπληρωματικά προστίθενται αντιβιοτικά στο υγρό υλικό της φιάλης. Για το σκοπό αυτό υπάρχουν τα ακόλουθα φιαλίδια: MB/BacT Antibiotic Supplement και το MB/BacT Reconstitution Fluid. Το πρόσθετο μίγμα MB/Bact Antibiotic Supplement, περιέχει αμοτερισίνη, αζλοσιλλίνη, ναλιδιξικό οξύ, πολυμυξίνη Β και τριμεθοπρίμη. Ανασυστήστε με 10ml Reconstitution Fluid που περιέχει: Tween 80, γλυκερόλη, αμάρανθο (κόκκινη χρωστική) σε νερό. Οι φιάλες Process Bottle και τα πρόσθετα συστατικά για λήψη αίματος και



μυελού διαφέρουν στο περιεχόμενο τους αλλά η διαδικασία είναι ίδια. Περιεχούν ουσίες που διαλύουν τα ερυθρά, όπως παράγοντα λύσης σαπωνίνη, SPS, τα οποία προφυλάσσουν από δημιουργία πύγματος και διευκολύνουν την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων.

1) Αναγράφουμε το όνομα του ασθενούς στη φιάλες,

2) Αποστειρώνουμε με οινόπνευμα ή άλλο αντισηπτικό το καπάκι της φιάλης.

Περιμένουμε να στεγνώσει.

3) Λίγο πριν τον ενοφθαλμισμό προσθέτουμε 0,5ml από το ανασυσταθέν MB/BacT Antibiotic Supplement σε κάθε Process Bottle που θα χρησιμοποιηθεί για κάθε δείγμα. Το ροζ χρώμα στο υλικό δείχνει ότι η ανασύσταση έγινε με επιτυχία.

Τα παρακάτω βήματα γίνονται στους θαλάμους βιοασφάλειας επιπέδου τρία (τα λεγόμενα HOOD).

4) Με σύριγγα για φυματίνη μεταφέρουμε 0,5ml δείγμα ασθενούς στη φιάλη υπό άσηπτες συνθήκες. Ταυτόχρονα εμβολιάζουμε και τα δύο Lowenstein-Jensen. Η φιάλη τοποθετείται στο μηχάνημα, όπου μένει για 42 ημέρες. Όλες οι θετικές φιάλες ελέγχονται για μυκοβακτηρίδιο με χρώση και καλλιέργεια. Στο hood ανακινείται η θετική φιάλη, αποστειρώνεται το καπάκι και παίρνεται το δείγμα με σύριγγα. Αν η χρώση ZN είναι αρνητική γίνεται χρώση Gram. Αν η χρώση Gram είναι αρνητική, ξαναφορτώνεται η φιάλη στο μηχάνημα σαν ψευδώς θετική. Αν υπάρχουν επιμολύνσεις (θα το δούμε από την θετική Gram), παίρνουμε καινούργιο δείγμα.

#### *Συνθήκες συντήρησης*

Όλα τα υλικά συντηρούνται στο ψυγείο (2-8°C). Όταν ανασυσταθεί το MB/BacT Antibiotic Supplement συντηρείται για 7 ημέρες σε 2-8°C ή για 1 μήνα στους -20°C.

#### ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 4

**Ανίχνευση *Mycobacterium tuberculosis complex* άμεσα σε δείγμα με τη μέθοδο:**

**Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct (AMTD)**, (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA).

Βασίζεται στην τεχνολογία TMA – Transcription Mediated Amplification.

Με μηχανικό τρόπο, όπως με υπέρηχους (sonication), καταστρέφεται το μυκοβακτηρίδιο.

Στη συνέχεια, απελευθερώνονται νουκλεϊκά οξέα, τα οποία θερμαίνονται στους 95°C, με αποτέλεσμα την μετουσίωση τους και καταστροφή της δευτεροταγής δομής του RNA. Η μέθοδος AMTD χρησιμοποιώντας σταθερή θερμοκρασία τους 42°C, πολλαπλασιάζει ειδικό στόχο RNA του μυκοβακτηριδίου με μετάφραση ενδιάμεσων DNA προϊόντων με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό πολλών αντιγράφων RNA amplicon. Η ανίχνευση των ειδικών αλληλουχιών του *M.tb.complex* στο RNA amplicon γίνεται με τη μέθοδο του υβριδισμού. Το αντιδραστήριο του υβριδισμού περιέχει μόνη άλυσσο του DNA ανιχνευτή (probe), σημαδεμένο με εστέρα της ακριανής. Ο DNA ανιχνευτής (probe) είναι συμπληρωματικός στις ειδικές αλληλουχίες των *M. tb.complex*. Δημιουργείται σταθερό RNA-DNA υβρίδιο μεταξύ του ανιχνευτή και των ειδικών αλληλουχιών. Ξεχωρίζουν τα υβριδοποιημένα probe από τα μη υβριδοποιημένα με το διάλυμα επιλογής (Selection reagent). Τέλος, τοποθετούνται τα σωληνάρια στο λουμινόμετρο, όπου παράγεται και αναγνωρίζεται το σήμα της φωταύγειας ως μονάδες Relative light units (RLU).

*Προετοιμασία των εργαστηρίου:*

- Πλύση όλων των επιφανειών εργασίας με διάλυμα χλωρίνης.
- Γεμίζουμε τη συσκευή υπερήχων (sonicator) με απ.νερό έως την ένδειξη.

- Θέτουμε σε λειτουργία το sonicator για 15 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες.
- Ανάβουμε τη θερμαινόμενη συσκευή στους 95°C, 60°C και 42°C βαθμούς μισή ώρα νωρίτερα.

*Προετοιμασία αντιδραστηρίων:* σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά για το Amplification reagent γίνεται ανασύσταση του λυοφιλοποιημένου με 3ml του reconstitution buffer με vortex. Το Enzyme reagent ανασυσταίνεται με 1,5ml από το enzyme dilution buffer με ελαφριά ανακίνηση έως την πλήρη διάλυση. Κάνουμε Vortex του hybridization buffer και θέρμανση στους 60°C για 3-4 λεπτά. Ακολουθεί Vortex για δεύτερη φορά και προσθέτουμε 6 ml στο λυοφιλοποιημένο probe reagent. Δύο λεπτά το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου και πάλι vortex. Αμέσως μετά την ανασύσταση των αντιδραστηρίων, ακολουθεί η τοποθέτησή τους σε ξεχωριστές μικρές ποσότητες (aliquots) και η συντήρησή τους στους -20°C για δύο μήνες ή ένα μήνα στους 2-8°C.

*Τεχνική:*

Μετά την εξουδετέρωση και ρευστοποίηση των δειγμάτων γίνεται λήψη του ιζήματος. Τα ιζήματα των δειγμάτων μπορεί να φυλάγονται στους 2-8°C για 3 ημέρες ή στους -20°C, ή -70°C για 6 μήνες. Ετοιμάζονται δύο σωληνάρια για κάθε δείγμα, ένα σωληνάριο λύσης με 50μl με υγρό λύσης (sample dilution buffer) και δεύτερο σωληνάριο με διάλυμα πολλαπλασιασμού καλυμμένο με 200μl λάδι (oil reagent) επίσης και για τους δύο μάρτυρες (θετικός και αρνητικός).

- Ο,450ml από το ίζημα τοποθετείται στα σωληνάρια λύσεως και vortex.
- Η απομόνωση του DNA γίνεται στο θάλαμο υπερήχων για 15 λεπτά (τα σωληνάρια να είναι καλά βυθισμένα στο νερό, χωρίς να ακουμπάνε στα

τοιχώματα του) και στη συνέχεια 25μl από το δείγμα τοποθετείται στα σωληνάρια πολλαπλασιασμού στους 95°C βαθμούς για 20 λεπτά.

- Ακολουθεί επώαση στους 42°C για 5 λεπτά.
- Προστίθεται 25μl από το ανασυσταθέν ένζυμο και επώαση στους 42°C για τουλάχιστον μισή ώρα. Εάν χρειασθεί μπορούμε να φυλάξουμε τα δείγματα στα amplification tubes στους 2-8°C για δύο ώρες ή όλη νύχτα στους -20°C. Εάν γίνει το παραπάνω, τα σωληνάρια τοποθετούνται στους 42°C για 10 λεπτά πριν προχωρήσουμε στο επόμενο στάδιο.
- Προστίθεται 100μl από το διάλυμα υβριδισμού σε κάθε σωληνάριο και επωάζονται στους 60°C για 15 λεπτά.
- Τέλος, προστίθεται 300μl υπόστρωμα και ακολουθεί επώαση στους 60°C για αλλά 15 λεπτά.

Στο λουμινόμετρο κάνουμε τρία πλυσίματα με το Detection reagent.

Μετά από παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, τα σωληνάρια φωτομετρούνται στο λουμινόμετρο στο πρωτόκολλο 28.

*Ερμηνεία αποτελεσμάτων:*

Η τιμή αποκοπής (cut-off) του Gen-probe AMTD ορίζεται στις 30.000 RLU.

Κάθε δείγμα με σήμα >30.000 RLU(Relative light units) θεωρείται θετικό.

Τιμές μεταξύ 20.000- 29.999 χρίζουν επανάληψη.

Ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να έχει σήμα <20.000 RLU.

Ο θετικός μάρτυρας πρέπει να έχει σήμα  $\geq 500.000$  RLU.

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 5

**Ανίχνευση *Mycobacterium tuberculosis complex* άμεσα σε δείγμα με τη μέθοδο:**

**GenoType Mycobacteria Direct v.4.0 A (Cycler), DNA strip test, (Hein Lifescience)**

*Μεθοδολογία απομόνωσης RNA με χρήση αιθανόλης*

*α) Προετοιμασία:*

- Απαιτείται αιθανόλη 96%(150μl/ δείγμα) και 70% 1ml/δείγμα
- Θερμάνετε στους 37°C το LB για 15 λεπτά.
- Άνοιγμα του ξηρού επωαστικού στους 85°C.
- Πρόσθεση 60μl CRB στο ICR(=30 αντιδράσεις) και vortex.
- BB/ICR mix: για κάθε δείγμα γίνεται ανάμιξη 2μl ανασυσταθέν ICR με 100μl BB και vortex.
- Πρόσθεση 15μl CRB στο Positive control RNA (=3 αντιδράσεις) και vortex.
- MB/BIN για 1 δείγμα: 33μl MB+ 220μl BIN

Για 8 δείγματα: 264μl MB+ 1.760μl BIN

MB vortex πριν τη χρήση.

- Αραίωση ανασυνταγμένου PC RNA για την προετοιμασία του positive control sample: Για κάθε θετικό μάρτυρα, γίνεται ανάμιξη 5μl ανασυνταγμένου PC RNA με 500μl νερό και vortex.

*β ) Διαδικασία: για κάθε δείγμα, (τα δείγματα του αναπνευστικού επεξεργάζονται με την μέθοδο Nalc/NaOH).*

- Πρόσθεση 230μl MB/BIN σε 1,5μl σωληνάριο με βιδωτό πώμα.
- Πρόσθεση 500-1000μl στο σωληνάριο και προσεκτική ανάμιξη του δείγματος.

- Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά στο Μαγνήτη με μέσα τη μπάρα,(θέση A) για 2 λεπτά.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου χωρίς να χαθεί το ίζημα.
- Αφαίρεση της μπάρας και πρόσθεση 50μl ζεστό LB. Ανάδευση με πιπέτα.
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πρόσθεση 150μl 96% αιθανόλης, vortex και επώαση για 5 λεπτά.
- Τοποθέτηση ξανά της μπάρας στον μαγνήτη (θέση A), επώαση για 2 λεπτά και αναποδογύρισμα του μαγνήτη με τα δείγματα μία φορά.
- Επώαση 1 λεπτό ακόμα και αφαίρεση του υπερκειμένου.
- Αφαίρεση της μπάρας και πρόσθεση 1ml 70% αιθανόλης. Vortex.
- Προσθήκη της μπάρας και επώαση 2 λεπτά. Αναποδογύρισμα. Επώαση 1 λεπτό ακόμα και αφαίρεση του υπερκειμένου. Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση όλο το υπόλειμμα υγρού.
- Αφαίρεση της μπάρας και πρόσθεση 100μl BB+ICR (vortex) πριν τη χρήση και ανάδευση.
- Επώαση στους 85° στο ξηρό επωαστικό κλίβανο με ανοιχτό καπάκι για 20 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκείμενο RNA σε καθαρό σωληνάριο. Χρησιμοποιείται 10μl για τον πολλαπλασιασμό.

*Μεθοδολογία πολλαπλασιασμού: Τεχνική NASBA σε κυκλοποιητή.*

Υπολογισμός των αριθμό δειγμάτων (+ θετικό και αρνητικό μάρτυρα)

- Για κάθε αντίδραση σε 11,5 PN mix (Primer/Nucleotide mix), προσθέτουμε 3,5μl DMSO (Dimethyl Sulfoxid), προς αποφυγή επιμολύνσεων.
- Ολικός όγκος PN mix= 15μl PN mix X αριθμό δειγμάτων.

- Μείγμα ένζυμο EML για 8 αντιδράσεις: 15 λεπτά πριν την προσθήκη διαλύεται το λυοφιλοποιημένο ένζυμο προσθέτοντας 44μl από το διαλυτικό του ένζυμο (EDB). Αφήνετε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

*Προγραμματισμός του κυκλοποιητή για την αντίδραση PCR:*

Αναδιάταξη: 8 λεπτά στους 65°C (B1)

Ψύξη: 5 λεπτά στους 41°C (B2)

Προσθήκη ένζυμο: 5 λεπτά στους 41°C+5μl ένζυμο (B3)+καπάκι

Πολλαπλασιασμός: 60 λεπτά στους 41°C (B4)

*NASBA αντίδραση:* Για κάθε αντίδραση τοποθετούμε 15μl PN mix σε ένα σωληνάριο 0,2ml για PCR και ανακατεύουμε με 10μl του δείγματος από το βήμα 2(βλ.προγρ.PCR). Καλύπτομε το δείγμα με 20-30μl παραφινέλαιο και μεταφέρεται χωρίς να καλυφθεί στον κυκλοποιητή . Όταν ολοκληρωθούν τα πρώτα δύο βήματα, ακολουθεί ένα διάλειμμα 5 λεπτών, όπου προσθέτουμε 5μl από το Διάλυμα του ένζυμο σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης. Κλείνουμε τα σωληνάρια με το καπάκι τους στη φάση του πολλαπλασιασμού. Τα δείγματα από την αντίδραση PCR, διατηρούνται στους -20°C για 3 ημέρες πριν τον υβριδισμό.

#### *ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ*

Χρησιμοποίηση ανακινούμενο υδατόλουτρο με σκέπασμα.

- Τοποθέτηση 20μl DENaturation solution σε κάθε αυλάκι της πλάκας.
- Πρόσθεση 20μl από το προϊόν του PCR στη σταγόνα του DEN
- Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αριθμώ τις ταινίες.
- Πρόσθεση 1ml από το προθερμασμένο Hybridization buffer.

- Τοποθέτηση της ταινίας.
- Επώαση 30 λεπτά στους 50°C.
- Πρόσθεση σε κάθε αυλάκι 1ml προθερμασμένο Strigent Wash solution και επώαση 15λεπτα στους 50°C.
- Ανασύσταση Conjugate solution 1:100 σε Conjugate buffer και πρόσθεση 1ml σε κάθε αυλάκι. Επώαση 30 λεπτά στους 20-25°C.
- Πλύσιμο με 1ml Rinse solution 1λεπτό.
- Πλύσιμο ξανά με αποσταγμένο νερό.
- Ανασύσταση Substrate solution 1:100 σε Substrate buffer, τοποθέτηση 1ml σε κάθε αυλάκι και επώαση 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύσιμο με απ.νερό για διακοπή της αντίδρασης.
- Ανάγνωση αποτελεσμάτων.



## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 6

**GenoType MTBDRPlus (Hein-Lifescience): Ταυτόχρονη ανίχνευση του *M.Tb.complex* και γόνους αντοχής στη ριφαμπικίνη και ισονιαζίδι, άμεσα σε κλινικά δείγματα**

**GenoType MTBDRsl (Hein-Lifescience): Ταυτόχρονη ανίχνευση του *M. tb.complex* και γόνους αντοχής στις φλουοροκινολόνες (οφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη), στις αμινογλυκισίδες (αμικασίνη, καναμυκίνη, καπρεομυκίνη) και εθαμβουτόλη.**

Μοριακή μέθοδος για διερεύνηση των υποκείμενων μηχανισμών αντοχής των κλινικών δειγμάτων και στελεχών *M. tuberculosis complex*, απομονωθέντων στο Νοσοκομείο μας.

### *Απομόνωση του DNA:*

- 500μl επεξεργασμένου κλινικού δείγματος και για δείγματα από καλλιέργεια: 1ml από υγρή καλλιέργεια ή αρκετές αποικίες από στερεή καλλιέργεια διαλυμένες σε 300μl νερό, φυγοκεντρώνονται σε 10000×g για 15 λεπτά.
- Πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 100μl απ.νερό.
- Επώαση των δειγμάτων για 20 λεπτά στους 95°C.
- Επώαση των δειγμάτων για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο υπερήχων.
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά σε 12000×g

### *Πολλαπλασιασμός του DNA:*

#### Προγραμματισμός των κύκλων στο θερμοκυκλοποιητή:

✓ Άμεσα από δείγμα:

1κύκλος για 5λεπτά στους 95°C.

10 κύκλοι για (30δευτερόλεπτα στους 95°C και 2λεπτά στους 58°C).

30 κύκλοι από (25 δευτερόλεπτα στους 95°C, 40 δευτερόλεπτα στους 53° και 40 δευτερόλεπτα στους 70°C).

1 κύκλος για 8λεπτά στους 70°C

✓ Από καλλιέργεια:

1κύκλος για 5λεπτά στους 95°C.

10 κύκλοι για (30δευτερόλεπτα στους 95°C και 2λεπτά στους 58°C).

20 κύκλοι από (25 δευτερόλεπτα στους 95°C, 40 δευτερόλεπτα στους 53° και 40 δευτερόλεπτα στους 70°C).

1 κύκλος για 8λεπτά στους 70°C).

Για κάθε αντίδραση 50μl, προετοιμάζεται το ακόλουθο μίγμα:

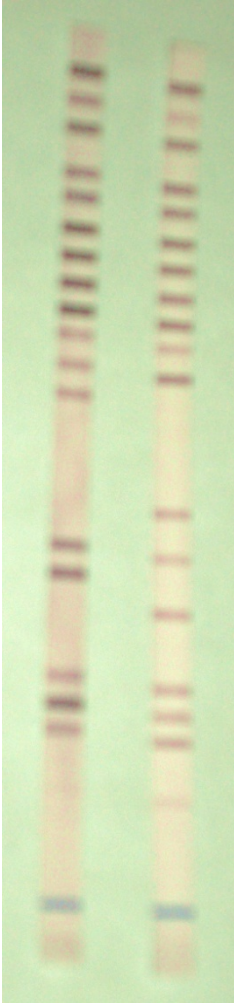
- ✓ 35 μl Primer-Nucleotide-Mix (PNM)
- ✓ 5μl 10×thermostable DNA polymerase buffer
- ✓ 9,8μl απ.νερό
- ✓ 5μl από το πολλαπλασιασμένο δείγμα
- ✓ 0,2μl hot start DNA polymerase.

### *Υβριδισμός*

Προθέρμανση των διαλειμμάτων Hybridization και Stringent

- ✓ Τοποθέτηση 20μl Denaturation solution στην άκρη του αυλακιού.
- ✓ Πρόσθεση 20μl από το πολλαπλασιασμένο δείγμα στο DEN solution.
- ✓ Πρόσθεση 1ml Hybridization buffer κάθε αυλάκι.
- ✓ Τοποθέτηση αριθμημένης ταινίας σε κάθε αυλάκι.
- ✓ Επώαση 30 λεπτών σε κινούμενο υδατόλουτρο στους 50°C.

- ✓ Αφαίρεση του υγρού με πιπέττα
- ✓ Πρόσθεση 1ml Stringent Wash solution σε κάθε ταινία και επώαση για 15 λεπτά στους 50°C.
- ✓ Αφαίρεση όλου του υγρού με την πλάκα.
- ✓ Ξέπλυμα με 1ml Rinse Solution.
- ✓ Πρόσθεση 1ml αραιωμένο 1:100 Conjugate σε κάθε ταινία και επώαση για 30 λεπτά σε κινούμενο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Αφαίρεση του υγρού και ξέπλυμα δύο φορές, μία με 1ml Rinse Solution, και μία με 1ml απ.νερό, για ένα λεπτό την κάθε φορά.
- ✓ Τοποθέτηση 1ml αραιωμένο 1:100 Substrate Solution σε κάθε ταινία.
- ✓ Επώαση 3-15λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Διακοπή της αντίδρασης με ξέπλυμα με απ.νερό.



1      2

**Εικ. 14.** Παράσταση θετικών αντιδράσεων σε ταινίες με τη μέθοδο GenoType MTBDRPlus. Θετικές γραμμές στις θέσεις 1-2 αντιστοιχεί στο Mycobacterium genus, στη θέση 3 αντιστοιχεί το *M. tb.complex* (ταινίες **1-2**), στις θέσεις 4-16: για την αντοχή στη ριφαμπικίνη (*rpoB*), στις θέσεις 17-20 και 21-27 αντιστοιχεί για την αντοχή στην ισονιαζίδη (*katG* και *inhA*) αντίστοιχα, Άγριος τύπος χωρίς μετάλλαξη (ταινία **1**), Αντοχή στη ριφαμπικίνη: μετάλλαξη στο *rpoB* (MUTB-553L) και στη IZN μετάλλαξη στο *katG* (MUT1-C15T), (ταινία **2**).

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 7

### **Βιοχημικές δοκιμασίες:**

#### **1) Παραγωγή Νιασίνης**

Αρχή της μεθόδου: Όλα τα μυκοβακτηρίδια παράγουν νικοτινικό οξύ όταν αναπτύσσονται. Το *M.tuberculosis*, καθώς και μερικά στελέχη *M. simiae*, *M. chelonae*, σπανιότατα *M. africanum*, *M. bovis*, *M. marinum* δεν μεταβολίζουν το νικοτινικό οξύ περαιτέρω και έτσι η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Η νιασίνη εκκρίνεται στο άγαρ από όπου μπορεί να αποσπαστεί και να ανιχνευθεί από την αντίδραση της με το κυανιούχο βρωμίδιο, παρουσία αμύνης. Αποτέλεσμα: παραγωγής κίτρινης χρωστικής στο υγρό. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε ταινίες εμπλουτισμένες με κυανιούχο βρώμιο.

Εκτέλεση:

- Προσθέτουμε 1ml απ.νερό στο σωληνάριο Lowenstein-Jensen με τις αποικίες.  
Τρυπάμε την επιφάνεια του υλικού για να διευκολυνθεί η είσοδος του νερού στο υπόστρωμα . Τοποθετούμε το σωληνάριο οριζόντιος έτσι που το υλικό να καλύπτει την επιφάνεια.
- Αναμονή > από 15 λεπτά.
- Αφαιρούμε 0,6ml από το έκκριμα σε κατάλληλο σωληνάριο των 5ml.
- Βάζουμε την ταινία στο σωληνάριο με το βέλος προς τα κάτω. Το σωληνάριο παραμένει καλά βιδωμένο.
- Αναμονή για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και κάθε 5-10 λεπτά ανακινείται ελαφριά.
- Παρατηρούμε για παρουσία κίτρινου χρώματος στο υγρό, που σημαίνει θετικό αποτέλεσμα.

## 2) Αναγωγή Νιτρικών

*Αρχή της μεθόδου:* Μόνο μερικά είδη μυκοβακτηριδίων, ιδίως το *M. tuberculosis*, παράγουν νιτρορεδουκτάση η οποία καταλύει τη μετατροπή νιτρικών σε νιτρώδη. Η εμφάνιση κόκκινης χροιάς μετά την προσθήκη σουλφανιδικού οξέος και N-ναφθυλενδιαμίνη σε άγνωστη καλλιέργεια, σημαίνει θετική δοκιμασία από την ύπαρξη νιτρώδους. Είναι δοκιμασία ακριβή, όχι μόνο για ταυτοποίηση *M. tuberculosis*, αλλά και για την ταυτοποίηση του *M. kansasii*, του *M. szulgai*.

Εκτέλεση:

- Καλή ανάπτυξη αποικιών σε καλλιέργεια Lowenstein-Jensen, μεγαλύτερη των 3 εβδομάδων.
- Δίσκοι ή ταινίες εμποτισμένες με υπόστρωμα νιτρικών.
- Προσθέτουμε 0,15ml απ.νερό σε μικρό σωληνάριο με καπάκι που περιέχει το δίσκο
- Διαλύω 2 αποικίες καλλιέργημα στο σωληνάριο.
- Κλείνω καλά το καπάκι του σωληναρίου και το τοποθετώ στον κλίβανο στους 37°C για δύο ώρες.
- Προσθέτω τα δύο αντιδραστήρια (δύο σταγόνες από το N<sup>o</sup>1-sulfanilamide, και δύο σταγόνες από το N<sup>o</sup>2-naphthylethylenediamin).
- Βαθύ κόκκινο χρώμα σημαίνει θετική αντίδραση.

## 3) Δοκιμή ευαισθησίας στην T<sub>2</sub>CH (Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide)

*Αρχή της μεθόδου:* Το *M. tuberculosis* και τα περισσότερα βραδέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια είναι ανθεκτικά στο υλικό thiophene-2-carboxylic acid hydrazide

(T<sub>2</sub>CH). Το M.bovis και μερικά ανθεκτικά στην ισονιαζίδη στελέχη είναι ευαίσθητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις του T<sub>2</sub>CH. Η δοκιμασία αυτή είναι χρήσιμη για την διάκριση μεταξύ M.tuberculosis και M.bovis.

Εκτέλεση:

- Παρασκευάζεται θολερό μικροβιακό διάλυμα σε απ.νερό.
- Ενοφθαλμίζεται 0,2ml από το διάλυμα σε ένα σωληνάριο L-J, που περιέχει T<sub>2</sub>CH και σε άλλο σωληνάριο L-J χωρίς T<sub>2</sub>CH (μάρτυρας).
- Επώαση στους 37°C έως και 3 εβδομάδες μετά την ανάπτυξη του μάρτυρα, εάν δεν έχει αναπτυχθεί νωρίτερα.
- Το M.tuberculosis είναι ανθεκτικό στην ουσία T<sub>2</sub>CH (θετικός μάρτυρας), και η ανάπτυξη του είναι > του 1% από την ανάπτυξη του μάρτυρα. Το M.bovis είναι ευαίσθητο στο T<sub>2</sub>CH, (αρνητικός μάρτυρας).

#### **4) Δοκιμασίες παραγωγής καταλάσων**

*Αρχή της μεθόδου:* Τα περισσότερα μυκοβακτηρίδια παράγουν καταλάση, αλλά δεν είναι όλα ικανά να παράγουν θετική αντίδραση μετά από θέρμανση στους 68°C για 20 λεπτά (θερμοανθεκτική καταλάση). Τα περισσότερα στελέχη M.tuberculosis και άλλα του συμπλέγματος M.tb.complex δεν παράγουν θερμοανθεκτική καταλάση, με εξαίρεση μερικά ανθεκτικά στην Ισονιαζίδη στελέχη για τα οποία τα αποτελέσματα του τεστ αυτού έχουν σημαντική αξία. Η δραστηριότητα της καταλάσης μετριέται και με το ύψος του αφρού που σχηματίζεται όταν προστίθεται υπεροξείδιο του υδρογόνου στο καλλιέργημα.

*α ) Ημιποσοτική παραγωγή καταλάσης*

*Η δοκιμασία χωρίζει τα μυκοβακτηρίδια σε δύο ομάδες: αυτά που παράγουν στήλη αφρού <45 χιλ.(χαμηλή καταλάση) και αυτά που παράγουν στήλη αφρού >45 χιλ.(ψηλή καταλάση). Χρησιμοποιούμε καλλιέργημα μίας εβδομάδος ή θολερό διάλυμα αποικιών.*

- Παραγωγή φρέσκο διάλυμα 1:1 του 10% Tween 80 και 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 10% Tween 80 γίνεται ως εξής: ζεσταίνεται Tween 80 και 90 ml απ.νερό σε υδατόλουτρο 50°C. Με πιπέττα ευρέως στομίου παίρνουμε 10ml Tween 80 και το μεταφέρνουμε στο απ.νερό. Αφήνουμε τη φλάσκα στο υδατόλουτρο έως ότου διαλυθεί το Tween 80. Φυλάσσεται στους 2-8 βαθμούς Κελσίου. Αμέσως πριν τη χρήση, ενώνουμε τα δύο αντιδραστήρια.
- Σωληνάρια με L-J, μη κεκλιμένα και με βάθος, εμβολιάζονται με 0,2ml μικροβιακό εναιώρημα.
- Επώαση του υλικού για 14 ημέρες στους 37°C με χαλαρό το καπάκι του σωληναρίου.
- Πρόσθεση 1ml από το φρέσκο αντιδραστήριο Tween 80, αναμονή σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μέτρηση του ύψος του αφρού: >45χιλ. η ψηλή καταλάση.  
<45χιλ. η χαμηλή καταλάση.

*β ) Δοκιμασία Θερμοανθεκτικής καταλάσης*

Το M.tuberculosis και μερικά άλλα μυκοβακτηρίδια χάνουν τη δραστηριότητα της καταλάσης τους όταν θερμανθούν στους 68°C.



Εκτέλεση: Για κάθε δείγμα χρειάζονται 2 σωληνάκια.

- Πρόσθεση 1ml απ.νερό 0,067N PBS στο ένα σωληνάριο.
- Ενοφθαλμίζεται σε αυτό αρκετές αποικίες. Vortex.
- Μεταφορά 0,5ml στο δεύτερο σωληνάριο.
- Επώαση του πρώτου σε υδατόλουτρο στους 68°C για 20 λεπτά.
- Πρόσθεση φρέσκου αντιδραστηρίου Tween 80- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Αναμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Δεν πρέπει να γίνεται ανάδευση του σωληναρίου. Παρατήρηση για φυσαλίδες. Η δοκιμασία χαρακτηρίζεται ως θετική ακόμα και όταν υπάρχουν πολύ λίγες και μικρές.

#### **5) Χρόνος ανάπτυξης αποικιών και παραγωγή χρωστικής**

Τα μυκοβακτηρίδια μπορεί να διαχωριστούν σε δύο ομάδες βάσει της ταχύτητας ανάπτυξης, της καταλληλότερης θερμοκρασίας ανάπτυξης και της παραγωγής χρωστικής σε φως και σε σκοτάδι. Αυτό γίνεται με την παρατήρηση της ανάπτυξης της ανακαλλιέργειας.

Εκτέλεση: Παρασκευή πυκνού εναιωρήματος με το υπό εξέταση μικρόβιο.

- Μεταφορά με πιπέττα Παστέρ 6 σταγόνων από το εναιώρημα σε 3 σωληνάκια με L-J. Άμεση κάλυψη των δύο με αλουμινόχαρτο.
- Επώαση του ενός σωληναρίου με αλουμινόχαρτο στους 25-30°C, τα υπόλοιπα δύο στους 37°C, με χαλαρά τα καπάκια.
- Εξέταση του σωληναρίου χωρίς αλουμινόχαρτο στις 3, 6 ημέρες και μετά κάθε εβδομάδα για ανάπτυξη και παραγωγής χρωστικής των αποικιών.

- Στις 3 εβδομάδες αφαιρείται το αλουμινόχαρτο και αναφέρεται η ανάπτυξη αποικιών και χρωστικής. Εξετάζεται μόνο για την παρουσία ή μη της κίτρινης ή πορτοκαλής χρωστικής. Ύπαρξη χρωστικής τόσο στο καλυμμένο, όσο και στο μη καλυμμένο ερμηνεύεται ως σκοτοχρωμογόνο. Εμφάνιση χρωστικής στο μη καλυμμένο μόνο σωληνάριο, ερμηνεύεται ως φωτοχρωμογόνο. Τότε γίνεται το τεστ φωτοευαισθησίας: έκθεση του σωληναρίου με καλλιέργεια χωρίς τη χρωστική, σε δυνατό φως για περίπου 5 ώρες, με χαλαρωμένο επιστόμιο. Επώαση ξανά του σωληναρίου στον κλίβανο για 24-48 ώρες για παρουσία χρωστικής. Παρουσία χρωστικής σημαίνει ότι το στέλεχος είναι φωτοχρωμογόνο.
- Τα μυκοβακτηρίδια που αναπτύσσουν αποικίες σε χρόνο λιγότερο της μίας εβδομάδας χαρακτηρίζονται ως ταχέως αναπτυσσόμενα.

## 6 ) Παραγωγή Αρυλ-σουλφατάσης

Το ένζυμο αρυλ-σουλφατάση είναι ικανό να υδρολύσει το δεσμό μεταξύ θειικού άλατος και του αρωματικού δακτυλίου της χημικής ουσίας καλιούχος φαινόλφθαλείνης. Η ελεύθερη φαινόλφθαλείνη αναγνωρίζεται από το κόκκινο χρώμα που σχηματίζεται όταν προστίθεται αλκαλική ουσία. Τα περισσότερα μυκοβακτηρίδια έχουν το ένζυμο αυτό αλλά οι συνθήκες της αναγνώρισης του διαφέρουν μεταξύ των μυκοβακτηριδίων.

Αντιδραστήρια:

- Υπόστρωμα αρυλ-σουλφατάση stock: 2,6gr phenol phthalein disulfate tripotassium, διαλύεται σε 50ml απ.νερό. Φύλαξη στο ψυγείο στους 2-8 βαθμούς επ' αόριστον.

- Διάλυμα αρυλ-σουλφατάσης, δοκιμασία τρίτης μέρας: 2,5ml stock αρυλ-σουλφατάσης προστίθεται σε 200ml Dubos Tween broth. Μοιράζεται 2,0ml σε σωληνάρια με καπάκι. Φυλάσσεται στους 2-8 βαθμούς και πετάγεται όταν θολώσει.
- Διάλυμα αρυλ-σουλφατάσης, δοκιμασία 2 εβδομάδων: 7,5stock αρυλ-σουλφατάσης προστίθεται σε 200ml Dubos Tween broth. Μοιράζεται 2,0ml σε σωληνάριο με καπάκι και φυλάσσεται στους 2-8 βαθμούς.
- 2N Sodium Carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ): διαλύονται 10,6γρ άνυδρο ανθρακικό νάτριο σε 100ml.

Διαδικασία:

- αποικίες από L-J διαλύονται σε απ. νερό και επώζονται για 3 ή για 14 ημέρες. Προσθέτουμε στο σωληνάριο με το υπόστρωμα , θολερό διάλυμα μυκοβακτηριδίου και αναδεύουμε.
- Επώαση για 3 ημέρες στους 37°C.
- Προσθέτουμε 1ml 2N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Ανάδευση και παρατήρηση για αλλαγή χρώματος. Θετικό αποτέλεσμα είναι το βαθύ κόκκινο. Αρνητικό- καμιά αλλαγή χρώματος.

### **7) Ανάπτυξη σε άγαρ Mac Conkey χωρίς Crystal violet.**

Το Mac Conkey χωρίς crystal violet χρησιμοποιείται για διαχωρισμό στελεχών Ταχέως αναπτυσσόμενων μυκοβακτηριδίων. Τα περισσότερα στελέχη *M.fortuitum* complex και *M.chelonae* complex θα αναπτυχθούν σε αυτό.

Εκτέλεση:

- Ενοφθαλμίζονται 3-4 σταγόνες από τη φιάλη ή αποικίες από L-J.
- Επώαση στους 30°C.
- Έλεγχος ανάπτυξης στις 5 και 11 ημέρες.

#### **8 ) Δοκιμή παραγωγής ουρεάσης.**

Η ικανότητα υδρόλυσης της ουρίας χρησιμοποιείται για την διαφοροποίηση μυκοβακτηριδίων.

Αντιδραστήρια:

- Ένα μέρος urea agar σε 9 μέρη απ. νερό, (10γρ agar σε 90ml H<sub>2</sub>O)
- Καλή ανάμιξη.
- Μοιράζεται 0,3ml από το μίγμα σε σωληνάριο με καπάκι.
- Φυλάσσεται έως 1 μήνα στους 2-8°C.

Εκτέλεση:

- Ενοφθαλμίζονται αποικίες στο σωληνάριο με το αντιδραστήριο.
- Επώαση στους 37°C για 5 ημέρες. Έλεγχος για σκούρου ροζ έως κόκκινο χρώμα.

Θετικά στην παραγωγή ουρεάσης: *M.fortuitum*, *M.chelonae*, *M.flavescens*, *M.marinum*.

#### **9 ) Παραγωγή β-Γαλακτοζιδάσης (ONPG).**

Μερικά μυκοβακτηρίδια παράγουν β-γαλακτοσιδάση η οποία απελευθερώνει l'orthonitrophenyl που χρωματίζει το διάλυμα d'orthonitrophenyl B galactopyranoside (ONPG), κίτρινο.

Αντιδραστήρια: Δίσκοι με d'ONPG

*Εκτέλεση:*

- Προετοιμασία μικροβιακού διαλύματος κλίμακα Mac Farland 0,5.
- Τοποθέτηση του δίσκου d'ONPG.
- Επώαση σε 37° για 24 ώρες. Θετική αντίδραση : κίτρινο χρώμα.

*Θετικά στην β-γαλακτοζιδάση Μυκοβακτηρίδια: M. fortuitum, M. chelonae, M. szulgai, M. terrae.*

### **10 ) Υδρόλυση Tween 80**

Αρκετά βραδέως αναπτυσσόμενα σκοτοχρωμογόνα και μη φωτοχρωμογόνα μυκοβακτηρίδια έχουν την ικανότητα να υδρολύουν Tween 80. Όταν συνδεθεί το ουδέτερο ερυθρό με το Tween 80, το χρώμα τους γίνεται κεχριμπαρένιο. Η υδρόλυση του Tween 80 απελευθερώνει το ουδέτερο ερυθρό το οποίο επιστρέφει στο κανονικό κόκκινο χρώμα.

*Αντιδραστήρια:*

- 100ml 0,067 M phosphate buffer (ph7)
- 0,5ml Tween 80
- 0, 1% ουδέτερο ερυθρό.
- Ανάμιξη των τριών αντιδραστηρίων στη σειρά. Το υπόστρωμα τοποθετείται σε σωληνάρια με καπάκι από 4ml. Αυτόκαυστο 121°C για 10 λεπτά. Φύλαξη στο σκοτάδι στους 4°C.

*Εκτέλεση:*

- Ενοφθαλμίζεται καλλιέργημα σε σωληνάριο με το αντιδραστήριο.

- Επώαση στους 37°C στο σκοτάδι. Εξετάζεται το υγρό . Ταχέως θετική απάντηση εντός 3-6 ωρών: *M. kansasii*, βραδέως θετική απάντηση: *M. gordonae*.

### 11 ) Δοκιμή ανοχής στο χλωριούχο νάτριο.

Το *M.triviale* και τα περισσότερα ταχέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια, με εξαίρεση το *M.chelonae* subspp.*chelonae*, αναπτύσσονται στο υλικό L-J στο οποίο έχει προστεθεί το 5% χλωριούχο νάτριο.

*Αντιδραστήρια:*

- L-J άνευ 5% NaCl για μάρτυρας.
- L-J με 5% NaCl.
- Μικροβιακό εναιώρημα σε κλίμακα Mc Farland N<sup>o</sup> 1 σε 7H9 Middlebrook.

*Εκτέλεση:*

- 0,1ml μικροβιακό εναιώρημα ενοφθαλμίζεται στα 2 σωληνάρια με L-J.
- Επώαση των σωληνάρων σε πλάγια θέση, με χαλαρά τα καπάκια, για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία δωματίου (για τα ταχέως αναπτυσσόμενα) και στους 37°C για τα υπόλοιπα
- Στη συνέχεια επωάζονται για ακόμα 3 εβδομάδες σε όρθια θέση αν χρειαστεί. Εξετάζονται για ανάπτυξη κάθε εβδομάδα.

Θετικό αποτέλεσμα: ανάπτυξη και στα δύο σωληνάρια. Δεν είναι απαραίτητη ομοιόμορφη ανάπτυξη και στα δύο σωληνάρια. Αν δεν υπάρξει ανάπτυξη και στα 2 σωληνάρια, επαναλαμβάνεται το τεστ.

**Ταυτοποίηση Μυκοβακτηριδίων με ACCUPROBE-Mycobacteria Culture**

**Identification test (GEN-PROBE, bioMerieux)**

Μέθοδος ταυτοποίησης μετά από καλλιέργεια με DNA ανιχνευτή και υβριδισμό σε 75 λεπτά, για τα εξής μυκοβακτηρίδια: *M. tb.complex*, *M. avium complex*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*.

- Προθέρμανση του υδατόλουτρου και το λουτρό υπερήχων.
- Πρόσθεση 100μl από reagent 1 και reagent 2 σε σωληνάρια με σφαιρίδια (lysing tubes).
- Μια αποικία από στερεό υλικό ή 100μl από υγρή καλλιέργεια με θολερότητα >1της κλίμακας McFarland, τοποθετούνται στο lysing reagent tubes, vortex.
- Τοποθέτηση των lysing tubes στο λουτρό υπερήχων (sonicator) για 15 λεπτά.
- Ακολουθεί η τοποθέτησή τους στο υδατόλουτρο στους 95°C για 15 λεπτά.
- Μεταφορά 100μl του υλικού στα σωληνάρια πολλαπλασιασμού (amplification tubes), έτοιμα προς χρήση από τον κατασκευαστή. Στη φάση αυτή προσθέτουμε ένα σωληνάριο πολλαπλασιασμού για το θετικό μάρτυρα και ένα για τον αρνητικό μάρτυρα.
- Επώαση στους 60°C για 15 λεπτά.
- Πρόσθεση 100μl αντιδραστήριο υβριδισμού (hybridization buffer)
- Επώαση στους 60°C για 15 λεπτά.
- Πρόσθεση 300μl από το αντιδραστήριο επιλογής (selection reagent).
- Επώαση στους 60°C για 10 λεπτά
- Αναμονή 5λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Μέτρηση των σωληνάρων, σκουπισμένα με ελαφρώς βρεγμένο χαρτί, στο κατάλληλο πρωτόκολλο στο λουμινόμετρο, μέσα σε μία ώρα το πολύ.

*Ερμηνεία αποτελεσμάτων:*

- Η τιμή ορίζεται στις 30.000RLU.
- Κάθε σήμα >30.000RLU θεωρείται θετικό.
- Αν η τιμή είναι μεταξύ 20.000-29999RLU, η εξέταση επαναλαμβάνετε
- Τα controls πρέπει να πληρούν τα ακόλουθα
  - ✓ Positive control >30.000RLU.
  - ✓ Negative control <10.000RLU.

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 9

### **Ταυτοποίηση Μυκοβακτηριδίων με GenoType Mycobacterium CM (Common Species) και GenoType Mycobacterium AS (Additional species)**

*Αρχή της μεθόδου:* μοριακή μέθοδος ανίχνευτών (probes) γραμμικής διάταξης, βασισμένη στην αρχή του ανάστροφου υβριδισμού μετά από πολλαπλασιασμό (PCR) από υγρή ή στερεή καλλιέργεια. Η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση και ταυτοποίηση 13 ειδών για το GenoType Mycobacterium CM και 16 ειδών για το GenoType Mycobacterium AS.

*Εξαγωγή DNA:*

- 1ml υγρής καλλιέργειας φυγοκεντρήται 15λεπτά σε 10,000×g, πετάτε το υπερκείμενο και γίνεται ανασύσταση με 100-300μl νερό ενώ αποικίες από στερεό υλικό ενοφθαλμίζονται σε 300μl.



- Επώαση 20 λεπτών στους 95°C.
- Επώαση 15 λεπτών σε θάλαμο υπερήχων.
- Φυγοκέντρωση σε 11,000×g για 5 λεπτά.

*Πολλαπλασιασμός του DNA:* για κάθε αντίδραση γίνεται προετοιμασία 45μl του διαλύματος του PCR

- 35 μl PNM
- 5μl 10× buffer
- 9,8 μl νερό
- 2 units thermostable DNA polymerase
- 5 μl DNA product

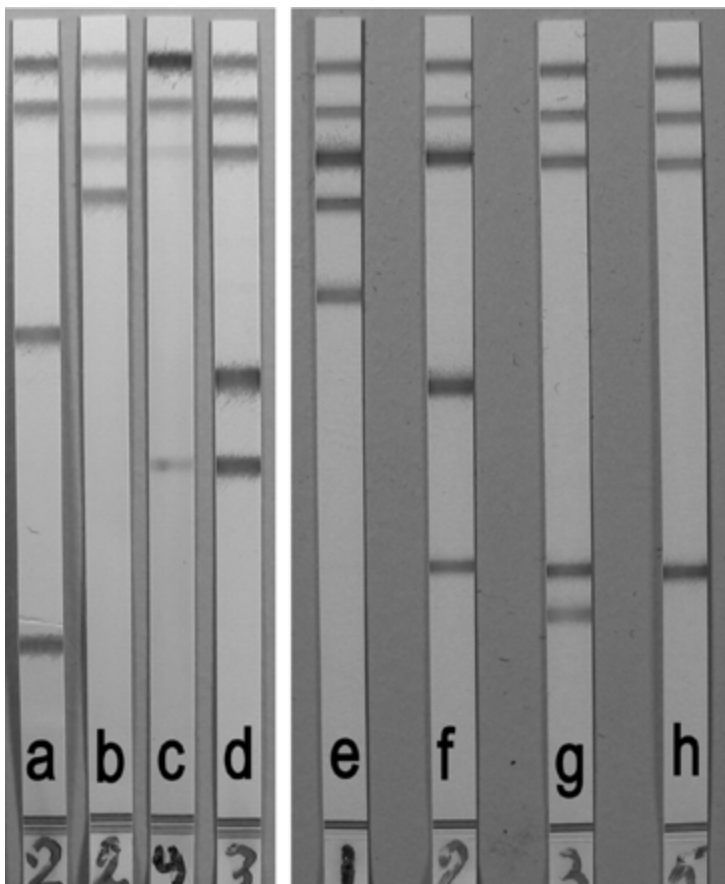
*Υβριδισμός:*

- Προθέρμανση στους 37°C το αντιδραστήριο του υβριδισμού HYB.
- 20 μl από το υγρό μετουσίωσης DEN σε κάθε αυλάκι.
- 20 μl από το πολλαπλασιασμένο προϊόν, ανακίνηση 5 λεπτά.
- Τοποθέτηση μία ταινία σε κάθε αυλάκι.
- Πρόσθεση 1ml Hybridization buffer και επώαση 30 λεπτών στους 45°C σε ανακινούμενο υδατόλουτρο.
- Πρόσθεση 1ml Strigent solution στο άδειο από το HYB αυλάκι και επώαση 15 λεπτών στους 45°C.
- Ξέπλυμα με Rinse solution.
- Πρόσθεση 1ml Conjugate solution (ανασύσταση 1:100 σε conjugate buffer) και επώαση 30 λεπτών στους 20-25°C.
- Ξέπλυμα με 1ml Rinse solution και 1ml απ.νερό.

- Πρόσθεση σε κάθε αυλάκι διάλυμα υποστρώματος 1ml Substrate solution (ανασύσταση 1:100 σε substrate buffer).
- Επώαση 2-20 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι, χωρίς ανακίνηση.
- Πρόσθεση απ. νερό για διακοπή της αντίδρασης.

*Ερμηνεία αποτελεσμάτων:*

- Η πρώτη θετική γραμμή είναι ένδειξη για την προσθήκη Conjugate και Substrate.
- Η δεύτερη γραμμή αντιστοιχεί στο γένος Mycobacterium και στα Gram(+) βακτήρια με υψηλή περιεκτικότητα G+C (universal control UC).
- Η τρίτη γραμμή αντιστοιχεί στο γένος Mycobacterium.
- Κάθε άλλη γραμμή στις θέσεις 4 έως 17 θεωρείται θετική όταν η έντασή της είναι ίσια ή μεγαλύτερη της universal control και αντιστοιχίζεται σε είδος μυκοβακτηριδίου σύμφωνα με τις εικόνες ερμηνείας του κατασκευαστή.



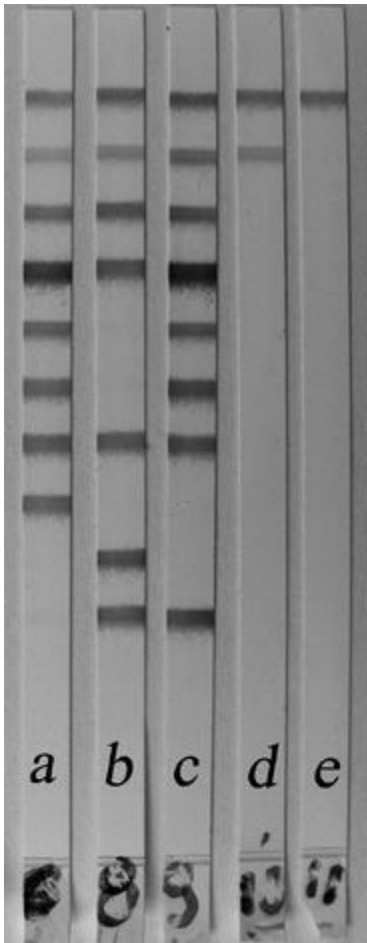
**Εικ.15** Παράσταση θετικών αντιδράσεων σε ταινίες με τη μέθοδο GenoType CM (ταινίες a- d) και AS (ταινίες e-h). Θετικές γραμμές 1-3 αντιστοιχούν στο είδος *Mycobacterium*. Η ταινία **a** με θετικές γραμμές 7 και 14 αντιστοιχεί στο *M. fortuitum*, η ταινία **b** (γραμμή 4) στο *M. avium*, η ταινία **c** (γραμμή 10)→σε μη-ταυτοποιήσιμο μυκοβακτηρίδιο, η ταινία **d** (γραμμές 8-10)→*M. goodii*, η ταινία **e** (γραμμές 4 και 6)→*M. simiae*, η ταινία **f** (γραμμές 8 και 10)→*M. szulgai*, η ταινία **g** (γραμμές 12 και 13)→*M. gastri*, η ταινία **h** (γραμμή 10)→ μη-ταυτοποιήσιμο μυκοβακτηρίδιο.

## **Ταυτοποίηση Mycobacterium Tuberculosis Complex με GenoType MTBC (Hein Lifescience)**

*Αρχή της μεθόδου:* μοριακή μέθοδος ανίχνευτών (probes) γραμμικής διάταξης, βασισμένη στην αρχή του ανάστροφου υβριδισμού (reverse hybridization). Η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση και ταυτοποίηση 6 ειδών του συμπλέγματος του Μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης μετά από πολλαπλασιασμό δείγματος από υγρή και στερεή καλλιέργεια. Η τεχνική εφαρμόζεται όπως στο πρωτόκολλο για τα Mycobacterium CM και AS.

### *Ερμηνεία αποτελεσμάτων:*

- Η πρώτη θετική γραμμή είναι ένδειξη για την προσθήκη Conjugate και Substrate.
- Η δεύτερη γραμμή αντιστοιχεί στο γένος Mycobacterium και στα Gram(+) βακτήρια με υψηλή περιεκτικότητα G+C (universal control UC).
- Η τρίτη γραμμή αντιστοιχεί στο γένος *M. tb.complex* probe.
- Κάθε θετική γραμμή στις θέσεις 4-13 αξιολογείται και αντιστοιχίζεται σε είδος *M. tb.complex* σύμφωνα με την εικόνα ερμηνείας του κατασκευαστή.



**Εικ.16** Παράσταση θετικών αντιδράσεων σε ταινίες με τη μέθοδο GenoType MTBC. Θετικές γραμμές στις θέσεις 1-2 αντιστοιχεί στο *Mycobacterium* genus (ταινία **d**), στη θέση 3 αντιστοιχεί το *M. tb.complex* (ταινίες **a-b-c**), στις θέσεις 1-8 αντιστοιχεί το *M. tuberculosis* (ταινία **a**), στις θέσεις 1-7 και 10 αντιστοιχεί το *M. africanum*1 (ταινία **c**), στις θέσεις 1-4, 7, 9 και 10 αντιστοιχεί το *M. bovis*sup.*bovis* (ταινία **b**).

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 10

### Ταχύ αντιβιόγραμμα με το σύστημα BACT/ALERT 3D

*Αρχή της μεθόδου:* ενσωμάτωση 0,5ml γνωστής συγκέντρωσης αντιφυματικού σε φιάλη με υγρό θρεπτικό υλικό και σποράς επί αυτού 0,5ml μικροβιολογικού εναιωρήματος. Δύο φιάλες χωρίς αντιφυματικού αλλά με την αντίστοιχη μικροβιολογική σπορά χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες, ο πρώτος (100%), είναι ο απόλυτος μάρτυρας και ο δεύτερος είναι ο αραιωμένος κατά 99% (1%) μάρτυρας.

*Αντιδραστήρια:*

- Φιαλίδια BacT/Alert
- SIRE: INH,RF,EMB,SM
- ✓ Κριτικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών:

Isoniazid	0,1 µg/ml
Rifampicin	1 µg/ml
Ethambutol	5µg/ml
Streptomycin	1µg/ml

*Εκτέλεση:*

Παρασκευή εναιωρήματος για κάθε αντιβιοτικό, μοίρασμα από 0,5ml σε πλαστικά σωληνάρια κατάψυξης και φύλαξη (1,2,3,4) σε -20°C

- Βγάζω τα αντιβιοτικά από την κατάψυξη για να ζεσταθούν.
- Παίρνω 6 φιάλες του συστήματος BacT/Alert 3D και τις αριθμώ (νούμερο δείγματος και 1-6).
- Προσθέτω 0,5ml reconstitution fluid σε κάθε μία φιάλη.

- Προσθέτω 0,5ml από τη θετική φιάλη ή από μικροβιακό εναιώρημα στερεού υλικού, μετά από θετική Z-N χρώση. Για αποικίες από L-J γίνεται εναιώρημα θολερότητας >1,0 Mc Farland σε σωληνάριο με 8-10 σφαιρίδια και ζωμό 7 H 9 Middlebrook. Vortex και αναμονή 20 λεπτών. Μεταφορά σε νέο σωληνάριο για ρύθμιση θολερότητας στο 0,5 της κλίμακας Mc Farland.
- Βάζω 0,5ml αντιβιοτικού στις πρώτες 4 φιάλες (1-4, INH,ΡΦ,ΕΜΒ,ΣΤΡ). Οι φιάλες 5 και 6 μάρτυροι.
- Στη φιάλη 6 μπαίνει μόνο το δείγμα, ενώ στη φιάλη 5 μπαίνει το δείγμα με αραίωση 1/100 (0,5ml σε 4,5ml νερό και από εδώ 0,5ml σε νέο 4,5ml και από εκεί ενοφθαλμισμός του δείγματος στη φιάλη.
- Φορτώνω κανονικά στο μηχάνημα για επώαση στους 37°C
- Ευαίσθητο χαρακτηρίζεται το μυκοβακτηρίδιο εφόσον η φιάλες με τα αντιβιοτικά (1-4), χτυπήσουν θετικές πριν τους μάρτυρες (6 και 5). Αυτό σημαίνει ότι ο ανθεκτικός πληθυσμός του βακτηρίου είναι λιγότερος από 1% (όπως είναι ο μάρτυρας 5), άρα ευαίσθητο στο αντίστοιχο αντιβιοτικό.

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 11

### **Αντιβιόγραμμα με τη μέθοδο αναλογιών Canetti (μέθοδος αναφοράς)**

Το θρεπτικό υλικό για τη δοκιμή είναι το Löwenstein-Jensen στο οποίο έχουν ενσωματωθεί τα αντιφυματικά φάρμακα.

- INH: 0,2 και 1μg/ml
- RF: 20 και 40μg/ml
- EMB: 2 και 3μg/ml
- SM: 4 και 10μg/ml
- PZA: 200g/ml pH 5, 5 με ξεχωριστούς μάρτυρες.
- RAS: 0,5 και 1μg/ml
- Δύο σωληνάρια L-J ως μάρτυρες.
- Προετοιμασία του μυκοβακτηριακού εναιωρήματος σε θολερότητα = με το μάρτυρα BCG (περίπου Mc Farland 3) ή να διακρίνονται καθαρά οι χοντρές μαύρες γραμμές, όταν διαβάζονται πίσω από το εναιώρημα.
- Εμβολισμός από 0,2ml από κάθε αραιώση σε σωληνάρια με αντιβιοτικό και αντίστοιχα σωληνάρια μαρτύρων.
- Επώαση στους 37°C.
- Ανάγνωση σε 21 και 28 ημέρες
- Προσεκτική μέτρηση αποικιών σε όλα τα σωληνάρια εξεταστέων και μαρτύρων.
- Καταγραφή αποτελεσμάτων:



	Σωληνάρια μαρτύρων	Σωληνάρια στελέχους
Αραίωση	Αποικίες	Αποικίες
$10^{-3}$	N°αποικιών	N°αποικιών
$10^{-5}$	N°αποικιών	N°αποικιών

- Υπολογισμός κριτικής συγκέντρωσης σύμφωνα με την παρακάτω αναλογία:

$$\frac{\text{Αριθμός αποικιών του στελέχους} \times \text{αραίωση}}{\text{Αριθμός αποικιών του μάρτυρα} \times \text{αραίωση}} \times 100 = \text{αριθμός\%}$$

Αριθμός αποικιών του μάρτυρα x αραίωση

**Ανθεκτικό** χαρακτηρίζεται ένα στέλεχος όταν αναπτύσσεται in vitro σε ποσοστό **>1%** (**κριτική αναλογία**) παρουσία της κριτικής συγκέντρωσης του αντιφυματικού φαρμάκου. Η **κριτική συγκέντρωση** αντιπροσωπεύει την χαμηλότερη συγκέντρωση του φαρμάκου που αναστέλλει το 99% των άγριων στελεχών του M.tuberculosis.

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 12

**Μέθοδος E-test (ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας MIC) για τα Βραδέως αναπτυσσόμενα Μυκοβακτηρίδια.**

*Αρχή της μεθόδου:* είναι μέθοδος για έλεγχο ευαισθησίας, η οποία προσδιορίζει τις ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής (MIC) για τα αντιμικροβιακά φάρμακα, σε βάση προκαθορισμένης διαβάθμισης αντιβιοτικού πάνω σε πλαστική ταινία. Η ταινία είναι εμποτισμένη με αντιβιοτικό, διαμετρημένη με συνεχόμενη λογαριθμική MIC κλίμακα, καλύπτοντας 15πλάσιες αραιώσεις. Η ταινία τοποθετείται στο άγαρ, γίνεται διάχυση του

αντιβιοτικού με τρόπο ώστε να διατηρείται η διαβαθμιζόμενη συγκέντρωσή του κατά μήκος της ταινίας. Μετά από επώαση 5-7 ημερών, παρατηρείται ζώνη αναστολής σε σχήμα εκλειπτικό. Η ζώνη αναστολής στο σημείο της ταινίας αντιπροσωπεύει την MIC στο αντιβιοτικό.

#### *Εκτέλεση:*

Πρώτη μέρα προετοιμασίας των τριβλίων με το μυκοβακτηρίδιο

- Αρκετές αποικίες από L-J τοποθετούνται σε σωληνάριο με μπίλιες και καλό vortex. Όταν το δείγμα είναι από φιάλη και η θολερότητα του είναι  $\geq 3$  Mc Farland, ακολουθείται η διαδικασία.
- Αναμονή για 20 λεπτά.
- Πρόσθεση τόσο ζωμό 7 H11 Middlebrook έως η θολερότητά του να φθάσει Mc Farland 3
- Με βαμβakoφόρο στείλεό σκουπίζουμε το υλικό στο τριβλίο με το υλικό, σε 7 H11 Middlebrook σε τρεις κατευθύνσεις
- Επώαση των τριβλίων για 24 ώρες στους 37°C σε 5%CO<sub>2</sub>.
- Εάν το δείγμα από φιάλη έχει θολερότητα <3 Mc Farland και το μηχάνημα δίνει GI>999, 1ml από τη φιάλη τοποθετείται στο τριβλίο. Το περίσσειμα απορρίπτεται με αποστειρωμένη πιπέτα. Επώαση για 24 ώρες.

Δεύτερη μέρα

- Μετά την επώαση εφαρμόζουμε τα E-test.
- Κάλυψη των τριβλίων με ταινία.
- Επώαση στους 37°C σε 5%CO<sub>2</sub> για 5-10 ημέρες.

- Διάβασμα των τριβλίων όταν η στιβάδα ανάπτυξης και η έλλειψη αναστολής είναι ορατή. Το διάβασμα μπορεί να γίνει νωρίτερα με μεγέθυνση X100. Καταγράφουμε το MIC όταν η έλλειψη αναστολής διασταυρώνεται με την MIC κλίμακα, αδιαφορώντας για τις μερικές διάσπαρτες αποικίες , ή την πολύ ασαφή ανάπτυξη. Για τα Breakpoints των MIC συμβουλευόμαστε τη βιβλιογραφία.

### ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 13

#### **Μέθοδος E-test για έλεγχο ευαισθησίας στα Ταχέως Αναπτυσσόμενα Μυκοβακτηρίδια.**

- Ομογενοποίηση 3-5 αποικιών στο σωληνάριο με τα γυάλινα σφαιρίδια.
- Προσθήκη φυσιολογικού ορού με θολερότητα ίσια σε κλίμακα Mc Farland 1.
- Ενοφθαλμισμό του μυκοβακτηριακού εναιωρήματος στα τριβλία με Mueller-Hinton blood agar.
- Στέγνωμα και τοποθέτηση των ταινιών.
- Επώαση στους 37°C για 72 ώρες , σε πλαστική σακούλα σε 5%CO<sub>2</sub>.
- Η MIC διαβάζεται μετά από 72 ώρες από την κλίμακα της ταινίας στο σημείο όπου δεν υπάρχουν αποικίες αλλά παρατηρείται ίχνος ανάπτυξης, ή σποραδικές αποικίες στη ζώνη αναστολής.

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 14

### **Μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου ακολουθούμενη από ταυτοποίηση με το λογισμικό BLAST.(186)**

Απομόνωση του DNA από το καλλιέργημα με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (21):

- Μικρή ποσότητα καλλιεργήματος μυκοβακτηριδίων διαλύεται σε 600μl εναιωρήματος λύσης (guanidinium thiocyanate 4 M, 0,5% N-lauryl sarcosine, 1 mM dithiothreitol, 25 mM sodium citrate και 50 μg glycogen).
- Επώαση 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 600μl παγωμένου (-20°C) isopropyl alcohol.
- Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ½ ώρα .
- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 10 λεπτά σε 16,600 g στους 4°C.
- Αφαιρείται η ισοπροπυλική αλκοόλη και το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη.
- Το στεγνό ίζημα διαλύεται σε 50 μl ελεύθερο από DNA-άση και RNA-άση, διπλά αποστειρωμένο νερό.

Πολλαπλασιασμός του DNA:

- Πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο αναλυτή αλληλουχιών (3730 DNA analyzer, Applied Biosystems).
- Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Big Dye terminator sequencing kit (Applied Biosystems).
- Χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές F16S, R16S, ITS2.

Σύγκριση αποτελεσμάτων αλληλουχιών με τις τράπεζες κατάθεσης γονιδίων:

GenBank (60) και RIDOM.

**Για ανάλυση του τμήματος διπλών βάσεων 439-bp του γονιδίου 65-kDA heat shock protein (*hsp65*) gene, χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό οι εναρκτές Tb11 και Tb12. (181)**

#### ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 15

#### **Μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)**

Τα προϊόντα της PCR από το γονίδιο *hsp65* αναλύθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ανάλυσης **RFLP**.

- 12μl προϊόν PCR διασπάστηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *Hae*III και *Bst*I (New England Biolabs).
- Το μείγμα μεταφέρεται για να τρέξει σε 3,5% metaphor agarose gel (Camprex Bioscience Inc.) σε 100 v.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ  
ΓΟΝΙΔΙΩΝ (16S r RNA και *hsp65*) στα νέα στελέχοι μυκοβακτηριδίων.**

*Αποτέλεσμα του προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδίου hsp65 στο νέο στέλεχος,  
Mycobacterium herakleense (GN01), όπως την προσδιόρισε η Ringuet, H. (1999). Το  
στέλεχος τοποθετείται πλησίον M. nonchromogenicum και M. hibernae.*

CTtAccaTGCAAGTCGaACGGAAAGGCCCTTTCGGGGTACTCGAGTGGCGAACGGgTgAgTAACACGTGG  
GTGATCTGC

CCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATAGGACCGCATGCTTCATGGTGTGTGG  
TGGAAAGCT

TTTGCGGTGTGGGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGG  
GTAGCCGGC

CTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
ATTGCACAA

TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAT  
CGGCGAAGC

TCCGGGATTTTTCTTGGGGTGACGGTAGGTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCcGCC

LOCUS bankit1069511 401 bp DNA linear BCT 04-MAR-2008  
 DEFINITION Mycobacterium sp.  
 ACCESSION 1069511  
 VERSION  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Mycobacterium sp.  
 ORGANISM Mycobacterium sp.  
     Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
     Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 401)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Gitti,Z., Krambovitis,E., Spandidos,D.A., Ruimy,R.,  
     Pierre-Audigier,C. and Gicquel,B.  
 TITLE Mycobacterium sp. GN-01 partial hsp65 sequencing  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 401)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Gitti,Z., Krambovitis,E., Spandidos,D.A., Ruimy,R.,  
     Pierre-Audigier,C. and Gicquel,B.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (04-MAR-2008) Mycobacteriology Laboratory, University  
     Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 712 01, Greece  
 COMMENT Bankit Comment: [zgitti@gmail.com](mailto:zgitti@gmail.com).  
 FEATURES Location/Qualifiers  
     source 1..401  
         /organism="Mycobacterium sp."  
         /mol\_type="genomic DNA"  
         /db\_xref="taxon:1785"  
 BASE COUNT 85 a 130 c 137 g 49 t  
 ORIGIN  
     1 cgccaaggag atcgagctgg aggacccta cgagaagatc ggcgccgagc tggtaaaga  
     61 ggteccaag aagaccgacg acgtcgcggg tgacggcacc accaccgcca cgtgctggc  
     121 ccaggccctg gtcaaggaag gctgcgcaa cgtggccgcc ggcgccaacc cgctgggtct  
     181 gaagcgcggc atcgagaagg cgttgagaa ggtcacctcg accctgctgg ctccgcca  
     241 ggaggtcgag accaaggagc agatcgcggc gaccgccggt atctccgcg ggcaccagac  
     301 catcggtgac ctgatcgcc aggccatgga caaggtcggc aacgagggtg tcataccgt  
     361 cgaggagtcc aacacctcg gtctgcagct ggagctcacc g  
 //

Strain GN-01 16S rRNA sequence

CATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCTTTCGGGGGTACTCGAGTGGCGAACG  
GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGA  
AACTGGGTCTAATACCGAATAGGACCGCATGCTTCATGGTGTGTGGTGGGA  
AAGCTTTTGCGGTGTGGGATGGGCCC GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGG  
GTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCC  
GGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGG  
GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTATCGGCGAAGCTCC  
GGGATTTTTCTTGGGGTGACGGTAGGTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTA  
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTA  
CTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTACGTTGTCCGTGAAACTC  
ACAGCTTAACTGTGGGCGTGCGGGCGATACGGGCAGACTGGAGTACTGTA  
GGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGA  
GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGG  
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC  
CGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCTTTAGGGATCCGTGCC  
GTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAA  
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGAT  
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCACAGGAC  
GCCAGCAGAGATGTTGGTTCCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGG  
CTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG  
CAACCCTTGTCTCATGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCGTGAGAGA  
CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGC  
CCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCT  
GCGATCCCGTGAGGGTTAGCGAATCCTTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT  
TGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA  
TCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  
CACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGG  
AGGGAG





**CERTIFICATE OF DEPOSIT  
IN THE PUBLIC COLLECTION**

F301 A

13/02/2006

Pagina 1 van 1

**BCCM™/LMG BACTERIA COLLECTION**

Universiteit Gent - Laboratorium voor Microbiologie

K.L. Ledeganckstraat 35

9000 Gent BELGIUM

Phone: +32-9-2645108 Fax: +32-9-2645346

Email: [bccm.lmg@UGent.be](mailto:bccm.lmg@UGent.be) Web site: <http://www.belspo.be/bccm>



**LMG 24735**

*Mycobacterium herakleum* strain GN1 was received  
for deposit in the public: BCCM/LMG Bacteria Collection from

Z. Gitti  
University Hospital of Crete  
Clinical Microbiological lab  
Dep. of Mycobacteriology  
Heraklion  
Greece

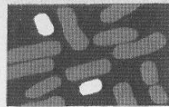
on August 7<sup>th</sup> 2008

and was, after confirming the viability and purity,  
allocated the accession number LMG 24735.

The strain is available to any *bona fide* individual,  
operating in a professional environment  
suitable for handling living material of the biohazard group involved.

Gent, December 1<sup>st</sup> 2008

ir. C. Vereecke  
Public Collection Curator  
BCCM/LMG Bacteria Collection



**NCTC**  
National Collection  
of Type Cultures

A Health Protection Agency Culture Collection

National Collection of Type Cultures  
Health Protection Agency  
Centre for Infections  
61 Colindale Avenue  
London, NW9 5EQ, United Kingdom

**T** +44 (0) 20 8327 6704 +44 (0) 20 8327 6774  
**F** +44 (0) 20 8205 7483  
**E** [nctc@hpa.org.uk](mailto:nctc@hpa.org.uk) **W** [www.nctc.org.uk](http://www.nctc.org.uk)

HPA Colindale SRM (NCTC)  
DX6530005  
Colindale NW



## CERTIFICATE OF DEPOSIT AND AVAILABILITY OF A TYPE STRAIN

Organism: *Mycobacterium herakleum*

Culture accession number: NCTC 13432 (= GN01)

Culture history: None given; presumed isolated in Crete. Deposited in NCTC by Z. Gitti in 2008.

This is to certify that the above type strain has been held by the NCTC since 2008 and passed all our routine viability checks and authentication controls.

Information on the strain will be included in our open database on the internet at [www.hpacultures.org.uk](http://www.hpacultures.org.uk)

There are no restrictions on the release of the strain.

Our practice is to make a type strain freely available on the date of issue of the journal publishing a formal description of the species, though the depositor may ask us to make the culture available at an earlier date.

Signature *Barry Holmes*

Date... 12<sup>th</sup> May 2009.....

LOCUS FJ425228 360 bp DNA linear BCT 24-  
 NOV-2008  
 DEFINITION Mycobacterium sp. GN-9680 65 kDa heat shock protein (hsp65)  
 gene,  
 partial cds.  
 ACCESSION FJ425228  
 VERSION FJ425228.1 GI:213493460  
 KEYWORDS .  
 SOURCE **Mycobacterium sp. GN-9680**  
 ORGANISM [Mycobacterium sp. GN-9680](#)  
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae;  
 Actinomycetales;  
 Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 360)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L.  
 and  
 Spandidos,D.A.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (28-OCT-2008) Department of Clinical  
 Bacteriology,  
 Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine,  
 University  
 Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201,  
 Greece  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..360  
 /organism="Mycobacterium sp. GN-9680"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="GN-9680"  
 /db\_xref="taxon:[574571](#)"  
 /country="Greece: University Hospital of  
 Heraklion"  
[gene](#) <1..>360  
 /gene="hsp65"  
[CDS](#) <1..>360  
 /gene="hsp65"  
 /codon\_start=1  
 /transl\_table=[11](#)  
 /product="65 kDa heat shock protein"  
 /protein\_id="[ACJ47905.1](#)"  
 /db\_xref="GI:213493461"  
  
 /translation="VAKKTDDVAGDGTTTATVLAQALVKEGLRNVAAGANPLGLKRGI  
 EKAVEKVTETLLKSAKEVETKEQIAATAAISAGDQSIGDLIAEAMDKVGNQEVITVEE  
 SNTFGLQLELTEGMRFDK"  
 ORIGIN  
 1 gtcgccaaga agaccgacga cgttgccggt gacggcacga cgacggccac  
 ggtgctggcc  
 61 cagggcgtcg tcaaggaagg tctgcgcaac gtcgcgggcg gggccaaccc  
 gctgggcctg

121 aagcgcggta tcgaaaaggc cgctcgagaag gtcaccgaga ccttgctgaa  
 gtcggccaag  
 181 gaggtcgaga ccaaggagca gatcgctgcc accgccgca tttcggctgg  
 cgaccagtcc  
 241 atcggcgacc tgatcgccga ggcgatggac aaggtcggca acgagggcgt  
 catcaccgtc  
 301 gaggagtcca acaccttcgg cctgcagctc gagctcaccg agggatgctg  
 gttcgacaag  
 //

LOCUS FJ425227 1790 bp DNA linear BCT 24-  
 NOV-2008

DEFINITION Mycobacterium sp. GN-9680 16S ribosomal RNA gene and 16S-  
 23S

ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence.

ACCESSION FJ425227

VERSION FJ425227.1 GI:213  
 493459

KEYWORDS .

SOURCE **Mycobacterium sp. GN-9680**

ORGANISM [Mycobacterium sp. GN-9680](#)

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae;

Actinomycetales;

Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1790)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L.  
 and

Spandidos,D.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-OCT-2008) Department of Clinical  
 Bacteriology,

Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine,

University

Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201,

Greece

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..1790

/organism="Mycobacterium sp. GN-9680"

/mol\_type="genomic DNA"

/strain="GN-9680"

/db\_xref="taxon:[574571](#)"

/country="Greece: University Hospital of

Heraklion"

[rRNA](#)

<1..1479

/product="16S ribosomal RNA"

[misc\\_RNA](#)

1480..>1790

/product="16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer"

ORIGIN

1 catgcaagtc gaacggaaag gcctcttcgg aggtactcga gtggcgaacg  
 ggtgagtaac

61 acgtgggcaa tctgccctgc acttcgggat aagcccggga aactgggtct  
 aataccggat

121 aggaccttta gacgcatgtc ttttggtgga aagcttttgc ggtgtgggat  
 gggcccgcgg

181 cctatcagct tgttgggtggg gtgatggcct accaaggcga cgacgggtag  
ccggcctgag  
241 aggggtgtccg gccacactgg gactgagata cggcccagac tcctacggga  
ggcagcagtg  
301 gggaaatattg cacaatgggc gcaagcctga tgcagcgacg ccgcgtgggg  
gatgacggcc  
361 ttcgggttgt aaacctcttt caccatcgac gaagggtccgg gttttctcgg  
attgacggta  
421 ggtggagaag aagcaccggc caactacgtg ccagcagccg cggtaatacg  
taggggtgca  
481 gcgttgtccg gaattactgg gcgtaaagag ctctgtaggtg gtttgtcgcg  
ttgttcgtga  
541 aatctcacgg cttaactgtg agcgtgcggg cgatacgggc agactagagt  
actgcagggg  
601 agactggaat tcctgggtgta gcgggtggaat gcgcagatat caggaggaac  
accggtggcg  
661 aaggcggggtc tctgggcagt aactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga  
gcgaacagga  
721 ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac ggtgggtact aggtgtgggt  
ttccttcctt  
781 gggatccgtg ccgtagctaa cgcattaagt accccgcctg gggagtacgg  
ccgcaaggct  
841 aaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca caagcggcgg agcatgtgga  
ttaattcgat  
901 gcaacgcgaa gaaccttacc tgggtttgac atgcacagga cgcgtctaga  
gataggcggt  
961 cccttgtggc ctgtgtgcag gtggtgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg  
tgagatggtg  
1021 ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg tctcatgttg ccagcgggta  
atgccgggga  
1081 ctctgtgagag actgccgggg tcaactcgga ggaagggtggg gatgacgtca  
agtcatcatg  
1141 ccccttatgt ccagggcttc acacatgcta caatggccgg taaaaagggc  
tgcatgccc  
1201 caagggttaag cgaatccttt taaagccggg ctctagttcgg attggggtct  
gcaactcgac  
1261 cccatgaagt cggagtcgct agtaatcgca gatcagcaac gctgcgggtga  
atacgttccc  
1321 gggccttgta cacaccgccc gtcacgtcat gaaagtcggt aacacccgaa  
gccagtggcc  
1381 taaccctttg ggagggagct gtcgaagggtg ggatcggcga ttgggacgaa  
gtcgtaacaa  
1441 ggtagccgta ccggaagggtg cggctggatc acctcctttc taaggagcac  
cacgaaaagc  
1501 actccaattg gtgggggtgag agccgtgagg ggttctcgtc tgtagtggac  
gagggccggg  
1561 tgcacaacag caaatgattg ccagacacac tattgggccc tgagacaaca  
ctcggccagt  
1621 ccgtgtggag tccctccatc ttgggtgggtg ggtgtgggtg ttgagtattg  
gatagtgggt  
1681 gcgagcatct agatgagcgc atggctccttt gtggctgatg cgttcatcaa  
aatgtgtaat  
1741 ttctttttga ttttttttgt gtgtaagtaa gtgttaaggg cgcagtgtgg  
//

## COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)



Universidad de Valencia  
Edificio de Investigación  
Campus de Burjassot  
46100 Burjassot (Valencia), España  
Tel.: +34 96 354 46 12  
Fax: +34 96 354 31 87  
e-mail: [info@cect.org](mailto:info@cect.org)  
<http://www.cect.org>



### CERTIFICATE OF DEPOSIT

The bacterial strain GN-9680 was deposited in the Spanish Type Culture Collection (CECT) as *Mycobacterium sp.* by Zoe Gitti from UNIVERSITY HOSPITAL OF CRETE, Mycobacterial Department, Microbiology laboratory, on 04-11-2008 and it was accessioned as CECT 7461.

This strain is viable, pure and publicly available according to the CECT rules. The depositor of this strain has confirmed the identity of the strain held under this CECT number

Burjassot, May the 25th 2009



**CERTIFICATE OF DEPOSIT  
IN THE PUBLIC COLLECTION**

F301 A

13/02/2006

Pagina 1 van 1

**BCCM™/LMG BACTERIA COLLECTION**

Universiteit Gent - Laboratorium voor Microbiologie

K.L. Ledeganckstraat 35

9000 Gent BELGIUM

Phone: +32-9-2645108 Fax: +32-9-2645346

Email: [bccm.lmg@UGent.be](mailto:bccm.lmg@UGent.be) Web site: <http://www.belspo.be/bccm>



**LMG 24834**

*Mycobacterium sp.nov.* strain GN-9680 was received  
for deposit in the public: BCCM/LMG Bacteria Collection from

Z. Gitti  
University Hospital of Crete  
Clinical Microbiological lab  
Dep. of Mycobacteriology  
Heraklion  
Greece

on November 21<sup>st</sup> 2008

and was, after confirming the viability and purity,  
allocated the accession number LMG 24834.

The strain is available to any *bona fide* individual,  
operating in a professional environment  
suitable for handling living material of the biohazard group involved.

Gent, February 2<sup>nd</sup> 2009

ir. C. Vereecke  
Public Collection Curator  
BCCM/LMG Bacteria Collection

# Mycobacterium sp. GN-11124 65 kDa heat shock protein gene, partial cdsv

LOCUS FJ652847 309 bp DNA linear BCT 02-MAR-2009

DEFINITION *Mycobacterium* sp. GN-11124 65 kDa heat shock protein gene, partial

cds.

ACCESSION FJ652847

VERSION FJ652847.1 GI:224042454

KEYWORDS .

SOURCE *Mycobacterium* sp. GN-11124

ORGANISM [Mycobacterium sp. GN-11124](#)

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae;

Actinomycetales;

Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 309)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Krambovitis,E.,

Zerva,L. and Spandidos,D.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (19-JAN-2009) Department of Clinical Bacteriology,

Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine,

University

Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201,

Greece

FEATURES

Location/Qualifiers

source

1..309

/organism="Mycobacterium sp. GN-11124"

/mol\_type="genomic DNA"

/strain="GN-11124"

/isolation\_source="patient clinical sample"

/host="Homo sapiens"

/db\_xref="taxon:[607700](#)"

/country="Greece: University Hospital of

Heraklion"

[CDS](#)

<1..>309

/codon\_start=1

/transl\_table=[11](#)

/product="65 kDa heat shock protein"

/protein\_id="[ACN38802.1](#)"

/db\_xref="GI:224042455"

/translation="DGTTTATVLAQALVREGLRNVAAGANPMALKRGIEKAVEKVTET

LLKSAKEVETKEQIAATAAISAADTQIGELIAEAMDKVGNEGVITVEESNTFGLQLEL

T"

ORIGIN

1 gacggcacca ccaccgccac cgtgctggcc cagggcgtcg tgcgcgaggg  
cctgcgcaac

61 gtcgcggcgg gtgccaaccc gatggcgctc aagcggggta tcgagaaggc  
cgtcgagaag



```

121 gtcaccgaga cgctgctgaa gtcggccaag gaggtcgaga ccaaggagca
gatcgctgcc
181 accgccgcca tctcggccgc cgacaccag atcggtgagc tcatcgccga
ggccatggac
241 aaggtcggca acgaggggtgt catcaccgtc gaggagagca acaccttcgg
cctgcagctg
301 gagctgacc
//

```

GenBank: FJ652846.1

## **Mycobacterium sp. GN-11124 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

LOCUS FJ652846 1383 bp DNA linear BCT 02-MAR-2009

DEFINITION *Mycobacterium* sp. GN-11124 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION FJ652846

VERSION FJ652846.1 GI:224042453

KEYWORDS .

SOURCE *Mycobacterium* sp. GN-11124

ORGANISM [Mycobacterium sp. GN-11124](#)  
Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae;  
Actinomycetales;  
Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1383)

AUTHORS Neonakis,I.K., Gitti,Z., Kontos,F., Baritaki,S., Krambovitis,E., Zerva,L. and Spandidos,D.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (19-JAN-2009) Department of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201, Greece

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1383  
/organism="Mycobacterium sp. GN-11124"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="GN-11124"  
/isolation\_source="patient clinical sample"  
/host="Homo sapiens"  
/db\_xref="taxon:[607700](#)"  
/country="Greece: University Hospital of Heraklion"

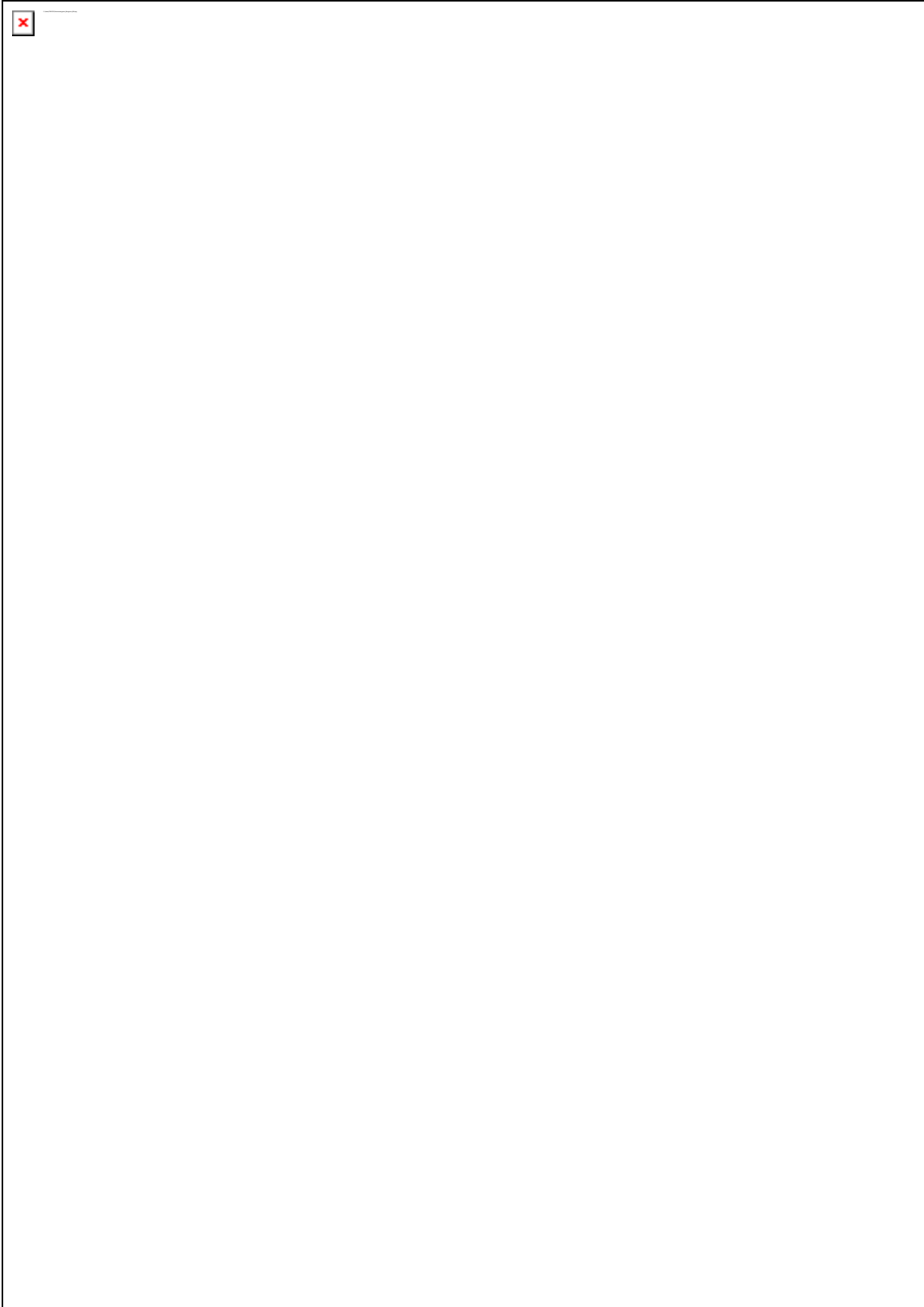
[rRNA](#) <1..>1383

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 tcgaacggaa aggccctttc gggggtgctc gagtggcgaa cgggtgagta
acacgtgggt
61 gatctgccct gcacttcggg ataagcctgg gaaactgggt ctaataccgg
ataggaccac
121 ggtctgcatg gattgtgggt gaaagctttt gcggtgtggg atgggcccgc
ggcctatcag
181 cttgttgggt ggggtgatggc ctaccaaggg gacgacgggt agccggcctg
agaggggtgtc
241 cggccacact gggactgaga tacggcccag actcctacgg gaggcagcag
tggggaatat
301 tgcacaatgg gcgcaagcct gatgcagcga cgccgcgtgg gggatgacgg
ccttcggggt
361 gtaaaccctt ttcaataggg acgaagcgcg agtgacggta cctatagaag
aagcaccggc
421 caactacgtg ccagcagccg cggtaatacg tagggtgcga gcgttgtccg
gaattactgg
481 gcgtaaagag ctcgtaggtg gtttgtcgcg ttgtccgtga aaactcacag
cttaactgtg
541 ggcgtgcbgg cgatacgggc agactggagt actgcagggg agactggaat
tcttgggtga
601 gcggtggaat gcgcagatat caggaggaac accggtggcg aaggcgggtc
tctgggcagt
661 aactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga gcgaacagga ttagataccc
tggtagtcca
721 cgccgtaaac ggtgggtact aggtgtgggt ttccttcctt gggatccgtg
ccgtagctaa
781 cgcattaagt accccgcctg gggagtacgg ccgcaaggct aaaactcaaa
ggaattgacg
841 ggggcccgca caagcggcgg agcatgtgga ttaattcgat gcaacgcgaa
gaaccttacc
901 tgggtttgac atgcacagga cgccggcaga gatgtcgggt cccttgtggc
ctgtgtgcag
961 gtggtgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc
cgcaacgagc
1021 gcaacccttg tctcatgttg ccagcgggta atgccgggga ctcgtgagag
actgccgggg
1081 tcaactcgga ggaaggtggg gatgacgtca agtcatcatg cccttatgt
ccagggttc
1141 acacatgcta caatggccgg taaaaagggc tgcgatgccg tgaggtggag
cgaatccttt
1201 caaagccggg ctcaattcgg atcggggtct gcaactcgac cccgtgaagt
cggagtgcgt
1261 agtaatcgca gatcagcaac gctgcgggtga atacgttccc gggccttgta
cacaccgccc
1321 gtcacgtcat gaaagtcggt aacaccgaa gccggtggcc taacccttg
tgggaggag
1381 ccg
```

//



LOCUS bankit1155853 382 bp DNA linear BCT 18-NOV-2008

DEFINITION Mycobacterium sp.

ACCESSION 1155853

VERSION

KEYWORDS

SOURCE Mycobacterium sp.

ORGANISM Mycobacterium sp.

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 382)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
Spandidos,D.A.

TITLE **Mycobacterium sp. strain GN-9188 65 kDa heat shock**  
protein(hsp65)gene, partial sequence

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 382)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
Spandidos,D.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-NOV-2008) Department of Clinical Bacteriology,  
Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University  
Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 712 01, Greece

COMMENT Bankit Comment:

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..382

/organism="Mycobacterium sp."

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:1785"

BASE COUNT 81 a 119 c 135 g 47 t

ORIGIN

1 cggcgccgag ctggtcaaag aggtcgccaa gaagaccgat gacgtggccg gtagcggcac  
61 caccaccgcc accgtgctgg cccaggecgt ggtcaaggaa ggctgcgca acgtggccgc  
121 cggcgccaac ccgtggccc tgaagcgccg catcgagaag gccgtcgaga aggtctccga  
181 gaccttctg aaggacgcca aggaggtcga gaccaaggag cagatcgccg cgaccgccgg  
241 gatctccgcg ggcgaccagt ccatcgggtga cctgatgcc gaggcgatgg acaaggtcgg  
301 caacgagggt gtcatcaccg tcgaggagtc gaacaccttc ggctgcaac tggagctcac  
361 cgagggtatg cggttcgaca ag

LOCUS bankit1155846 1404 bp DNA linear BCT 18-NOV-2008  
 DEFINITION Mycobacterium sp.  
 ACCESSION 1155846  
 VERSION  
 KEYWORDS  
 SOURCE Mycobacterium sp.  
 ORGANISM Mycobacterium sp.  
     Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
     Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1404)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
     Spandidos,D.A.  
 TITLE **Mycobacterium sp. strain GN-9188 16S ribosomal RNA gene**, partial  
     sequence  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1404)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
     Spandidos,D.A.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (18-NOV-2008) Department of Clinical Bacteriology,  
     Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University  
     Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201, Greece  
 COMMENT Bankit Comment: [ineonakis2@gmail.com](mailto:ineonakis2@gmail.com).  
 FEATURES Location/Qualifiers  
     source 1..1404  
         /organism="Mycobacterium sp."  
         /mol\_type="genomic DNA"  
         /db\_xref="taxon:1785"  
 BASE COUNT 301 a 333 c 478 g 292 t  
 ORIGIN

```

1 catgcaagtc gaacggaaag gccctttcgg gggactcga gtggcgaacg ggtgagtaac
61 acgtgggtga tctgcctgc actttgggat aagcctggga aactgggtct aataccgaat
121 atgatcatgc gcctcatggt gtgtggtgga aagcttttgc ggtgtgggat gggcccgcgg
181 cctatcagct tttggtggg gtaatggcct accaaggcga cgacgggtag ccggcctgag
241 aggggttccg gccacactgg gactgagata cggcccagac tctacggga ggcagcagtg
301 gggaatattg cacaatgggc gcaagcctga tgcagcgacg ccgcgtgggg gatgacggcc
361 ttcgggttgt aaacctctt cagtatcggc gaagctccag ggttttctt ggggtgacgg
421 taggtacaga agaagcaccg gccaactacg tgccagcagc cgcgtaata cgtagggtgc
481 gagcgtgtgc cggaattact gggcgtaaag agctcgtagg tggittgtcg cgttgcctgt
541 gaaaactcac agctcaactg tgggcgtgcg ggcgatacgg gcagactgga gtactgtagg
601 ggagactgga attcctggtg tagcgggtgga atgcgcagat atcaggagga acaccggtg
661 cgaaggcggg tctctgggca gtaactgacg ctgaggagcg aaagcgtggg gagcgaacag
721 gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acggtgggta ctagggtggt gtttcctcc
781 ttaggggatc cgtgccgtag ctaacgcatt aagtacccg cctggggagt acggccgcaa
841 ggctaaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg gcggagcatg tggattaatt
  
```

901 cgatgcaacg cgaagaacct tacctgggtt tgacatgcac aggacgccgg tagagatac  
961 ggttcccttg tggcctgtgt gcaggtggtg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat  
1021 gttgggftaa gtcccgaac gagcgcaacc ctgtctcat gttgccagca cgttatggtg  
1081 gggactcgtg agagactgcc ggggtcaact cggaggaagg tggggatgac gtcaagcat  
1141 catgccctt atgtccaggg cttcacacat gctacaatgg ccgtacaaa gggctcgtat  
1201 accgtgaggt ttagcgaatc ctftaaagcc ggtctcagtt cggatcgggg tctgcaactc  
1261 gaccccgta agtcggagtc gctagtaatc gcagatcagc aacgetgcgg tgaatacgtt  
1321 cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacgt catgaaagtc ggtaacacc gaagccggtg  
1381 gcctaaccct tgtggaggga gccg

//

LOCUS bankit1194996 372 bp DNA linear BCT 11-MAR-2009

DEFINITION Mycobacterium sp.

ACCESSION 1194996

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Mycobacterium sp.

ORGANISM Mycobacterium sp.

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 372)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Krambovitis,E.,  
Zerva,L. and Spandidos,D.A.

TITLE Mycobacterium sp. GN-10803 65 kDa heat shock protein gene, partial  
cds

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 372)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Krambovitis,E.,  
Zerva,L. and Spandidos,D.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (11-MAR-2009) Department of Clinical Bacteriology,  
Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University  
Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201, Greece

COMMENT Bankit Comment: [ineonakis2@gmail.com](mailto:ineonakis2@gmail.com).

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..372  
/organism="Mycobacterium sp."  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:1785"  
CDS <1..>372  
/note="hsp65"  
/codon\_start=1  
/transl\_table=11  
/product="65 KDa heat shock protein"

/translation="YEKIGAELVKEVAKKTDDVAGDGTATVLAQALVREGLRNVA

GANPLGLKRGIEKAVEKITESLLASAKEVETKEQIAATAGISAGDQSIGDLIAEAL  
DK

VGNEGVITVEESNTFGLQLELT"

BASE COUNT 77 a 123 c 124 g 48 t

ORIGIN

1 tacgagaaga tcggcgccga gctggtcaag gaagtgcca agaagacgga tgacgtcgcc  
61 ggcgacggca ccaccacggc caccgtgctc gccagggccc tggttcgca aggtctcgcc  
121 aacgtcgccg cggcgccaa cccgctcgcc ctgaagcgcg gcatcgagaa ggccgtcgag  
181 aagatcaccg agtcgctgct ggcacggccc aaggaggtcg agaccaagga gcagatcgct

241 gccaccgagg gcatctccgc cggtagaccag tcgatcggcg atctgatcgc cgaggcactc  
301 gacaaggctg gcaacgaggg tgatcacc gtcgaggagt cgaacacctt cggcctgcag  
361 ctgagctca cc

//



# COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)

Universidad de Valencia  
Edificio de Investigación  
Campus de Burjassot  
46100 Burjassot (Valencia), España  
Tel.: +34 96 354 46 12  
Fax: +34 96 354 31 87  
e-mail: info@cect.org  
<http://www.cect.org>



## CERTIFICATE OF DEPOSIT

The bacterial strain GN 10803 was deposited in the Spanish Type Culture Collection (CECT) as *Mycobacterium* sp. by Zoe Gitti from University Hospital of Crete, Mycobacterial Department, Microbiology Laboratory on 07-04-2009 and it was accessioned as CECT 7509.

This strain is viable, pure and publicly available according to the CECT rules. The depositor of this strain has confirmed the identity of the strain held under this CECT number



Burjassot, August the 31st 2009

LOCUS bankit1137071 1816 bp rRNA linear BCT 25-SEP-2008

DEFINITION Mycobacterium thermoresistibile.

ACCESSION 1137071

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE **Mycobacterium thermoresistibile**

ORGANISM Mycobacterium thermoresistibile

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;

Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1816)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and Spandidos,D.A.

TITLE Mycobacterium thermoresistibile 16S ribosomal RNA and ITS partial sequence

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1816)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and Spandidos,D.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-SEP-2008) Department of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201, Greece

COMMENT Bankit Comment: [ineonakis2@gmail.com](mailto:ineonakis2@gmail.com).

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1816

/organism="Mycobacterium thermoresistibile"

/mol\_type="rRNA"

/db\_xref="taxon:1797"

BASE COUNT 364 a 422 c 644 g 386 t

ORIGIN

```
1 agtgaacgg aaaggccct tgggggtgc tcgagtggcg aacgggtgag taacacgtgg
61 gtgatctgcc ctgcacttg ggataagcct gggaaactgg gtctaatacc gaatacacc
121 tgctggtcgc atggcctggt gggggaaagc gttttagcgc gtgtgggatg agcccgcggc
181 ctatcagctt gttggtgggg tgatggccta ccaaggcgac gacgggtage cggcctgaga
241 gggtgaccgg ccacactggg actgagatac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg
301 ggaatattgc acaatgggcg caagcctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg atgacggcct
361 tggggttgta aaccttttc agtcccacg aagcggaggt gacggtaggc acagaagaag
421 gaccggccaa ctactgcca gcagccgcgg taatacgtag ggtccgagcg ttgtccggaa
481 ttactgggcg taaagagctc gtagtggtt tgcgcgttg tccgtgaaaa ctacagctt
541 aactgtgggc gtgcgggcga tacgggcaga ctagagtact gcaggggaga ctggaattcc
601 tgggttagcg gtggaatgag cagatatcag gaggaacacc ggtggcgaag gcgggtctct
661 gggcagtaac tgacgctgag gagcgaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg
721 tagtccacgc cgtaaagggt ggtactagg tgtgggttct ttctgagga tccgtgccgt
781 agctaacgca ttaagtacc cgctgggga gtacggccgc aaggctaaaa ctcaaaggaa
```

841 ttgacggggg cccgcacaag cggcggagca tgtggattaa ttcgatgcaa cgcaagaac  
901 cttacctggg tttgacatgc acaggacgcc ggcagagatg tcggttcct tgtggcctgt  
961 gtcaggtgg tgcattgctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga  
1021 acgagcgcaa ccctgtctc atgttgccag cgggtaatgc cggggactcg tgagagactg  
1081 ccgggggtcaa ctcggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc atcatgcccc ttatgtccag  
1141 ggcttcacac atgctacaat ggccgggtaca aagggtcgcg aagccgtgag gtggagcgaa  
1201 tcctgcaaa gccgggtcga gttcggatcg ggtctgcaa ctcgaccccg tgaagtcgga  
1261 gtcgtagta atcgcagatc agcaacgctg cgggaatac gttcccgggc cttgtacaca  
1321 ccgcccgtca cgtcatgaaa gtcggtaaca cccgaagccg gtggcctaac cccgtctggg  
1381 gagggagccg tcgaaggtgg gatcggcgat tgggacgaag tcgtaacaag gtagccgtac  
1441 cggaaggtgc ggctggatca cctccttct aaggagcacc acgagaaaca tccccggtg  
1501 gtgggggtgt gtcctgtgtg gagtcggtt ctgtagtggc gccggctggg tgcgcaaca  
1561 acgtgttat ccctgtgaaa cgggtgtttt ttgggggtgg cgggatcacc ggacacacta  
1621 ttgggctttg aggcaacacg cctgtgtgtg cgccccgtct ttggtggtgg ggtgtggtg  
1681 ttgatttgtg gatagtgtt gcgagcatct agcacgcgcg agcctggtgc ccctggtttg  
1741 tgggggttgc gggttgtgt gtgggatgtg caatttctt gttttgtgct catggtgtg  
1801 taagtgtgtt agggcg

//

LOCUS bankit1137117 421 bp DNA linear BCT 25-SEP-2008

DEFINITION *Mycobacterium thermoresistibile*.

ACCESSION 1137117

VERSION

KEYWORDS

SOURCE ***Mycobacterium thermoresistibile***

ORGANISM *Mycobacterium thermoresistibile*

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 421)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
Spandidos,D.A.

TITLE ***Mycobacterium thermoresistibile* 65 kDa heat shock protein (hsp65)**  
gene partial sequence

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 421)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
Spandidos,D.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-SEP-2008) Department of Clinical Bacteriology,  
Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University  
Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201, Greece

COMMENT Bankit Comment: [ineonakis2@gmail.com](mailto:ineonakis2@gmail.com).

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..421  
/organism="Mycobacterium thermoresistibile"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:1797"  
CDS <1..>420  
/codon\_start=1  
/transl\_table=11  
/product="65 kDa heat shock protein"

/translation="AKEIELEDPYEKIGAELVKEVAKKTDDVAGDGTTTATVLAQALV

KEGLRNVAAGANPLALKRGIEAAVEKVTETLLKSAKEVETKEQIANTAAISAG  
DQQIG

ELIAEAMDKVGNVITVEESQTFGLQLELTEGMRFRQ"

BASE COUNT 93 a 130 c 144 g 54 t

ORIGIN

1 gccaaggaga tcgagctgga ggaccctac gagaagatcg gcgctgagct ggtcaaggaa  
61 gtcgccaaga agaccgacga cgtcgccggc gacggcacca ccaccgccac cgtcctggct  
121 cagcgctgg tgaaggaagg tttgcgcaac gtcgcggccg gggccaacce gtcgctctg  
181 aagcgcgga tcgaagccgc tgtcgagaag gtcaccgaga ccctgctcaa gtcggccaag  
241 gaggtcgaga ccaaggagca gatcgccaac accgcccga tctcgccgg cgaccagcag  
301 atcggtgagc tgatcgccga ggcgatggac aaggtcggca acgagggtgt catcaccgtc  
361 gaggagtcgc agacctcgg tetgcagctc gagtcaccg agggatgctg gtttcgaaa  
421 g

//

LOCUS bankit1138250 421 bp DNA linear BCT 29-SEP-2008  
 DEFINITION *Mycobacterium arupense*.  
 ACCESSION 1138250  
 VERSION  
 KEYWORDS .  
 SOURCE ***Mycobacterium arupense***  
 ORGANISM *Mycobacterium arupense*  
     Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
     Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 421)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
     Spandidos,D.A.  
 TITLE ***Mycobacterium arupense* strain NG-9722 65 kDa heat shock protein**  
     (hsp65) gene partial sequence  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 421)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
     Spandidos,D.A.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (29-SEP-2008) Department of Clinical Bacteriology,  
     Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University  
     Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201, Greece  
 COMMENT Bankit Comment: [ineonakis2@gmail.com](mailto:ineonakis2@gmail.com).  
 FEATURES Location/Qualifiers  
     source 1..421  
         /organism="Mycobacterium arupense"  
         /mol\_type="genomic DNA"  
         /db\_xref="taxon:342002"  
 BASE COUNT 94 a 139 c 137 g 51 t  
 ORIGIN  
     1 accaacgatg gtgtgtccat cgccaaggag atcgagctgg aggaccgta cgagaagatc  
     61 ggcgccgagc tggtaaaga ggtcgccaag aagaccgacg acgtcgcggg tgacggcacc  
     121 accaccgcca cgtgctcgc ccaggccctg gtcaaggaag gcctgcgcaa cgtagccgcc  
     181 ggcgccaacc cgctgggcct caagcgcggc atcgagaagg ccgtcgcaa gataccgaa  
     241 ggtctgctt ccacggcca ggcgatcgag accaaggacc agatcgcggc tacggccgt  
     301 atctccgcg gcgaccagac catcggtgac ctgatcgccg aggccatgga caaggtcggc  
     361 aacgagggtg tcataccgt cgaggagtcc aacaccttcg gcctgcagct ggagtcacc  
     421 g  
 //

LOCUS bankit1145022 1481 bp DNA linear BCT 20-OCT-2008  
 DEFINITION Mycobacterium arupense.  
 ACCESSION 1145022  
 VERSION  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Mycobacterium arupense  
 ORGANISM Mycobacterium arupense  
     Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
     Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1481)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
     Spandidos,D.A.  
 TITLE **Mycobacterium arupense strain GN-9722 16S ribosomal RNA and ITS**  
     partial sequence  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1481)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
     Spandidos,D.A.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-OCT-2008) Department of Clinical Bacteriology,  
     Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University  
     Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201, Greece  
 COMMENT Bankit Comment:  
 FEATURES Location/Qualifiers  
     source 1..1481  
         /organism="Mycobacterium arupense"  
         /mol\_type="genomic DNA"  
         /db\_xref="taxon:342002"  
 BASE COUNT 301 a 344 c 510 g 326 t  
 ORIGIN

```

1 cctgcacttt gggataagcc tgggaaactg ggtctaatac cgaataggac cgcattgctt
61 atggtgtgtg gtggaaagct tttcggtgtg gggatgggcc cgcggcctat cagcttggtg
121 gtggggtaat ggctaccaa ggcgacgacg ggtagccggc ctgagagggt gtccggccac
181 actgggactg agatacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa
241 tgggcgcaag cctgatgcag cgacgccgcg tgggggatga cggccttcgg gttgtaaacc
301 tctttcagta tggcgaagc tccaggattt ttctgggggt gacggtaggt acagaagaag
361 caccggccaa ctactgcca gcagccgagg taatacgtag ggtgcgagcg ttgtccggaa
421 ttactgggcg taaagagctc gtaggtggtt tgtcacgtg tccgtgaaaa ctcacagctt
481 aactgtgggc gtgcgggcca tacgggcaga ctggagtact gtaggggaga ctggaattcc
541 tgggttagcg gtggaatgcg cagatatcag gaggaacacc ggtggcgaag gcgggtctct
601 gggcagtaac tgacgtgag gagcgaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg
661 tagtccacgc cgtaaaccgt gggtagtagg tgtgggttc ctcccttag ggatccctgc
721 ctagtaaac gcattaagta ccccgctgg ggagtacggc cgcaaggcta aaactcaaag
781 gaattgacgg gggcccgcac aagcggcgga gcatgtgat taattcgatg caacgcgaag
  
```

841 aacctacct gggtttgaca tgcacaggac gccggtagag atacgggtc ccttgtggcc  
901 tgtgtgcagg tggatcatgg ctgtctcag ctctgtcgt gagatgttg gtaagtccc  
961 gcaacgagcg caaccttgt ctcattgtc cagcacgtaa tggtagggac tctgagaga  
1021 ctgccggggt caactcggag gaaggtgggg atgacgcaa gtcacatgc cccttatgc  
1081 cagggettca cacatgtac aatggccggt acaaaggct gcgatcccgt gagggttagc  
1141 gaatcctta aagccggtct cagttcggat tgggtctgc aactcagacc catgaagtcg  
1201 gagtcgctag taatcgaga tcagcaacgc tgcggtgaat acgttcccgg gccttgata  
1261 caccgccct cacgtcatga aagtcgtaa caccgaagc cggtaggcta acccttggg  
1321 agggagccgt cgaaggtggg tggccggccc ttgggttg gcacactgt ggtctgag  
1381 gcaacaggcc tgtttcgcc cctgtgtggg gtgggtgtgt tctcgtcca tcttgggtg  
1441 ggggtgtgt gttgtttg tgaatagtg ttgcagcat c

//

LOCUS bankit1155864 320 bp DNA linear BCT 18-NOV-2008

DEFINITION Mycobacterium sp.

ACCESSION 1155864

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Mycobacterium sp.

ORGANISM Mycobacterium sp.

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 320)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
Spandidos,D.A.

TITLE **Mycobacterium sp. strain GN-10546 65 kDa heat shock**  
protein(hsp65)gene, partial sequence

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 320)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
Spandidos,D.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-NOV-2008) Department of Clinical Bacteriology,  
Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University  
Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion 712 01, Greece

COMMENT Bankit Comment: [ineonakis2@gmail.com](mailto:ineonakis2@gmail.com).

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..320

/organism="Mycobacterium sp."

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:1785"

BASE COUNT 64 a 104 c 108 g 44 t

ORIGIN

1 ccaccgccac cgtgctggcc caggccctgg tcaaggaagg cctgcgcaac gtggccgccc  
61 gcgccaacc gctgggtctg aagcgcggca tcgagaaggc cgttgagaag gtcacctga  
121 cctgctggc ttcggccaag gaggtcgaga ccaaggagca gatcgcggcg accgccgta  
181 tctccgccc cgaccagacc atcgggtacc tgatgccga ggccatggac aaggtcggca  
241 acgagggtgt catcaccgtc gaggagtcca acacctcgg tctgcagctg gagctaccg  
301 agggtagcg ttacgacaag

//



LOCUS bankit1155867 1402 bp DNA linear BCT 18-NOV-2008  
 DEFINITION Mycobacterium sp.  
 ACCESSION 1155867  
 VERSION  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Mycobacterium sp.  
 ORGANISM Mycobacterium sp.  
     Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
     Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1402)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
     Spandidos,D.A.  
 TITLE **Mycobacterium sp. strain GN-10546 16S ribosomal RNA gene**, partial  
     sequence  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1402)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
     Spandidos,D.A.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (18-NOV-2008) Department of Clinical Bacteriology,  
     Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University  
     Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201, Greece  
 COMMENT Bankit Comment: [ineonakis2@gmail.com](mailto:ineonakis2@gmail.com).  
 FEATURES Location/Qualifiers  
     source 1..1402  
         /organism="Mycobacterium sp."  
         /mol\_type="genomic DNA"  
         /db\_xref="taxon:1785"  
 BASE COUNT 302 a 331 c 477 g 292 t  
 ORIGIN  
     1 catgcaagtc gaacggaaag gccctttcgg gggactcga gtggcgaacg ggtgagtaac  
     61 acgtgggtga tctgcctgc actttgggat aagcctggga aactgggtct aataccgaat  
     121 aggaccgcat gcttcattgt gtgtgggtga aagcttttgc ggtgtgggat gggcccgcgg  
     181 cctatcagct tgttgggtgg gtaatggcct accaaggcga cgacgggtag cggcctgag  
     241 aggggtgccg gccacactgg gactgagata cggcccagac tctacggga ggcagcagtg  
     301 gggaatattg cacaatgggc gcaagcctga tgcagcgacg ccgcgtgggg gatgacggcc  
     361 ttcgggttgt aaacctctt cagtatcggc gaagctccgg gattttctt ggggtgacgg  
     421 taggtacaga agaagcaccg gccaaactag tcccagcagc cgcgtaata cgtagggtgc  
     481 gagcgtgtgc cggaattact gggcgtaaag agctcgtagg tggtttgtca cgtgtccgt  
     541 gaaaactcac agcttaactg tgggcgtgcg ggcgatacgg gcagactgga gtactgtagg  
     601 ggagactgga attcctggtg tagcgggtga atgcgcagat atcaggagga acaccggtgg  
     661 cgaaggcggg tctctgggca gtaactgacg ctgaggagcg aaagcgtggg gagcgaacag  
     721 gattagatac cctggtagtc cagcccgtaa acggtgggta ctagggtggt gtttcttcc  
     781 tttaggatc cgtgccgtag ctaacgcatt aagtacccg cctggggagt acggccgcaa

841 ggctaaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg gcggagcatg tggattaatt  
901 cgatgcaacg cgaagaacct tacctgggtt tgacatgcac aggacgccag cagagatgt  
961 ggttcccttg tggcctgtgt gcaggtggtg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat  
1021 gttgggtaa gtcccgcaac gagegcaacc cttgtctcat gttgccagca cgttatggtg  
1081 gggactcgtg agagactgcc ggggtcaact cggaggaagg tggggatgac gtcaagtc  
1141 catgcccctt atgtccagg cttcacacat gctacaatgg ccgtacaaa gggctgcgat  
1201 cccgtgaggg ttagcgaatc ctttaaagcc ggtctcagtt cggattgggg tctgcaactc  
1261 gaccccatga agtcggagtc gctagtaatc gcagatcagc aacgctgcgg tgaatacgtt  
1321 cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacgt catgaaagtc ggtaacaccc gaagccggtg  
1381 gcctaaccct tgtggaggga gc

//

LOCUS bankit1155885 983 bp DNA linear BCT 18-NOV-2008  
 DEFINITION Mycobacterium sp. *Mycobacterium europaeum*  
 ACCESSION 1155885  
 VERSION  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Mycobacterium sp.  
 ORGANISM Mycobacterium sp.  
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
 Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 983)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
 Spandidos,D.A.  
 TITLE **Mycobacterium sp strain GN-10643 16S ribosomal RNA gene, partial  
 sequence**  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 983)  
 AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
 Spandidos,D.A.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (18-NOV-2008) Department of Clinical Bacteriology,  
 Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University  
 Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201, Greece  
 COMMENT Bankit Comment: [ineonakis2@gmail.com](mailto:ineonakis2@gmail.com).  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..983  
 /organism="Mycobacterium sp."  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /db\_xref="taxon:1785"  
 BASE COUNT 214 a 229 c 351 g 189 t  
 ORIGIN  
 1 catgcaagtc gaacggaaag gcccttcgg gggactcga gtggcgaacg ggtgagtaac  
 61 acgtgggcaa tctgcctgc acttcgggat aagcctggga aactgggtct aataccggat  
 121 aggaccactt ggcgcatgcc ttgtggtgga aagcttttgc ggtgtgggat gggcccgcgg  
 181 cctatcaget tgttggtggg gtgatggcct accaaggcga cgacgggtag cggcctgag  
 241 aggggtgtccg gccacactgg gactgagata cggcccagac tctacggga ggcagcagtg  
 301 gggaatattg cacaatgggc gcaagcctga tgcagcgacg ccgcgtgggg gatgacggcc  
 361 ttcgggtgtg aaacctctt cagcagggac gaagcgaaag tgacggtacc tgcagaagaa  
 421 gcaccggcca actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgtg ggggtgcgagc gttgtccgga  
 481 attactgggc gtaaagagct cgtaggtggt ttgtcgcgtt gttcgtgaaa accgggggct  
 541 taacctcgg cgtgcggcg atacgggcag actagagtac tgcaggggag actggaatc  
 601 ctggtgtagc ggtggaatgc gcagatatca ggaggaacac cggtggcgaa ggcgggtctc  
 661 tgggcagtaa ctgacgctga ggagcgaaag cgtggggagc gaacaggatt agataccctg

721 gtagccacg ccgtaaaccg tgggtactag gtgtgggtt ccttccttg gatccgtgcc  
781 gtagctaag cattaagtac cccgcctggg gtagcggcc gcaaggctaa aactcaaagg  
841 aattgacggg ggccccaca agcggcggag catgtggatt aattcgatgc aacgcgaaga  
901 accttacctg ggtttgacat gcacaggacg cgtctagaga taggcgttcc cttgtggcct  
961 gtgtgcaggt ggtgcatggc tgt

//

LOCUS bankit1155883 420 bp DNA linear BCT 18-NOV-2008

DEFINITION Mycobacterium sp. *Mycobacterium europaeum*

ACCESSION 1155883

VERSION

KEYWORDS

SOURCE Mycobacterium sp.

ORGANISM Mycobacterium sp.

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;  
Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 420)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
Spandidos,D.A.

TITLE **Mycobacterium sp strain GN-10643 65 kDa heat shock protein (hsp65)**  
gene, partial sequence

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 420)

AUTHORS Neonakis,I.K., Kontos,F., Gitti,Z., Baritaki,S., Zerva,L. and  
Spandidos,D.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-NOV-2008) Department of Clinical Bacteriology,  
Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University  
Hospital of Heraklion, Voutes, Heraklion, Crete 71201, Greece

COMMENT Bankit Comment: [ineonakis2@gmail.com](mailto:ineonakis2@gmail.com).

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..420

/organism="Mycobacterium sp."

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:1785"

BASE COUNT 91 a 131 c 150 g 48 t

ORIGIN

1 aagatcggcg ccgagctgga ggacccttac gagaagatcg ggcgccgact ggtcaaggaa  
61 gtcgccaaga agaccgacga cgtcgccggt gacggcacga cgacggccac ggtgctggcc  
121 caggcgtggt tcaaggagg cctgcgcaac gtcgcgggcg gcgccaaccg gctgagcctc  
181 aagcgcggca tcgagaaggc ggtcgagaag gtcaccgaga ccctgtctaa gtcggccaag  
241 gaggtcgaga ccaaggacca gatcgccgcc accgcggcga ttccgcggg cgaccagtcg  
301 atcggtgacc tgatcgcca ggcatggac aaggtcgga acgagggcgt catcacctc  
361 gaggagtcca acacctcgg cctgcagctc gagctaccg agggatgctg gttcgacaag

//

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Adekambi, T., Foucaunt, C., La Scola, B., and Drancourt, M. 2006. Report of Two Cases of *Mycobacterium mucogenicum* Central Nervous System Infection in Immunocompetent Patients. *J Clin Microbiol* 44:3.837-840
2. Alcaide, F., and A. Telenti. 1997. Molecular techniques in the diagnosis of drug-resistant tuberculosis. *Ann Acad Med Singapore* 26:647-50.
3. Fernando Alcaide,<sup>1\*</sup> Laura Calatayud,<sup>1</sup> Miguel Santín,<sup>2</sup> and Rogelio Martín<sup>1</sup> Comparative In Vitro Activities of Linezolid, Telithromycin, Clarithromycin, Levofloxacin, Moxifloxacin, and Four Conventional Antimycobacterial Drugs against *Mycobacterium kansasii*
4. Amdekar, Y. 2005. Tuberculosis - Persistent Threat to Human Health. *Indian J Pediatr* 72:333-338.
5. American Thoracic Society, Diagnostic standards and classification of Tb in adults and children. (*AM J Respir Crit Care Med* 2000.)
6. Badak, F. Z., S. Goksel, R. Sertoz, B. Nafie, S. Ermertcan, C. Cavusoglu, and A. Bilgic. 1999. Use of nucleic acid probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles. *J Clin Microbiol* 37:1602-5.
8. Bang D, Andersen AB, and Thomsen V. 2006. Rapid Genotypic Detection of Rifampin- and Isoniazid- Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Directly in Clinical Specimens. *JCM*, p.2605-2608.
9. Baylan, O., O. Kisa, A. Albay, and L. Doganci. 2004. Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratory diagnosis of tuberculosis and determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. *Int J Tuberc Lung Dis* 8:772-7.
10. Bergmann, J. S., and G. L. Woods. 1996. Clinical evaluation of the Roche AMPLICOR PCR *Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 34:1083-5.
11. Bergmann, J. S., G. Yuoh, G. Fish, and G. L. Woods. 1999. Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. *J Clin Microbiol* 37:1419-25.
- 12 Biehle, J., Cavallieri, S., Saubolle, A., and Getsinger, L. 1995. Evaluation of Etest for Susceptibility Testing of Rapidly Growing *Mycobacteria*. *J Clin Microbiol*.1760-1764

13. Bodie, E., Cunningham, J., Della-Latta, P., Schluger N., and Saiman, L. 2008. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria in Patients without HIV Infection, New York City. *Emerg Infect Dis* March
14. Broekmans JF, Migliori GB, Rieder HL, Lees J, Ruutu P, Loddenkemper R, and Raviglione MC. 2002. European framework for tuberculosis control and elimination in countries with low incidence. *Eur Respir J* 19: 765-775.
15. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, and Sougakoff V. 2006. Performance of the Genotype MTBDR Line Probe Assay for Detection of Resistance to Rifampin and Isoniazid in Strains of *Mycobacterium tuberculosis* with Low- and High- level Resistance. *JCM* p. 3659-3664
16. Barbara A. Brown-Elliott,\* Christopher J. Crist, Linda B. Mann, Rebecca W. Wilson, and Richard J. Wallace Jr. 2003, In Vitro Activity of Linezolid against Slowly Growing Nontuberculous Mycobacteria
17. Brown-Elliott, B., and Wallace, R. 2007 Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late –Pigmented Rapidly Growing Mycobacteria. *Cl microbial Rev.* 15.4.716-746
18. Burgos, M. V., and A. S. Pym. 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J Suppl* 36:54s-65s.
19. Canetti, G., S. Froman, J. Grosset, P. Hauduroy, M. Langerova, H. T. Mahler, G. Meissner, D. A. Mitchison, and L. Sula. 1963. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance. *Bull World Health Organ* 29:565-78.
20. Cardoso, R. F., R. C. Cooksey, G. P. Morlock, P. Barco, L. Cecon, F. Forestiero, C. Q. Leite, D. N. Sato, L. Shikama Mde, E. M. Mamizuka, R. D. Hirata, and M. H. Hirata. 2004. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3373-81.
21. Casas I., Klapper PE, Cleator GM, Echevaria JE, Tenorio A, Echevaria JM, 1995. Two different PCR assays to detect enteroviral RNA in CSF samples from patients with acute aseptic meningitis. *J Med Virol*; 47: 378-85.
22. Catanzaro A. Diagnosis, differentiating colonization, infection, and disease. 2002. *Clin Chest Med.* 23(3): 599-601.
23. Causse M, Ruiz P, Gutierrez JB, Zerolo J, and Casal M. 2008. Evaluation of new GenoType(R) MTBDRplus for detection of resistance in cultures and direct specimens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 12(12): 1456-60

24. Caviedes, L., T. S. Lee, R. H. Gilman, P. Sheen, E. Spellman, E. H. Lee, D. E. Berg, and S. Montenegro-James. 2000. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol* 38:1203-8.
25. CDC. Nucleic acid amplification tests for tuberculosis, MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report, 2000.
26. CDC. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs—Worldwide, 2000-2004
27. Chaves, F., M. Alonso-Sanz, M. J. Rebollo, J. C. Tercero, M. S. Jimenez, and A. R. Noriega. 2000. *rpoB* mutations as an epidemiologic marker in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 4:765-70.
28. Clarridge, J. E., 3rd, R. M. Shawar, T. M. Shinnick, and B. B. Plikaytis. 1993. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 31:2049-56.
29. Cloud, J. L., H. Neal, R. Rosenberry, C. Y. Turenne, M. Jama, D. R. Hillyard, and K. C. Carroll. 2002. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* 40:400-6.
30. Cloud, J., Meyer, J., Pounder, J., Kenneth, C., Jost, Jr., Sweeney, A., Carrol, Karen., and Woods, G. 2006. *Mycobacterium arupense* sp.nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. 56, 1413-1418
31. Cole ST, Barrell BG. 1998 [Analysis of the genome of \*Mycobacterium tuberculosis\* H37Rv](#). *Novartis Found Symp.* 1998;217:160-72; discussion 172-7. Review.
32. Cooksey, R. C., G. P. Morlock, A. McQueen, S. E. Glickman, and J. T. Crawford. 1996. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1186-8.
33. Cowan, L. S., L. Diem, T. Monson, P. Wand, D. Temporado, T. V. Oemig, and J. T. Crawford. 2005. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 43:688-95.

34. Cummings, G., Natarjan, S., Garces, M., 2000. Mycobacterium thermoresistible Recovered from Otherwise Healthy Individual. CID, 31,pp 121.
35. Del Portillo, P., M. C. Thomas, E. Martinez, C. Maranon, B. Valladares, M. E. Patarroyo, and M. Carlos Lopez. 1996. Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. J Clin Microbiol 34:324-8.
36. Garcia de Viedma, D., M. del Sol Diaz Infantes, F. Lasala, F. Chaves, L. Alcala, and E. Bouza. 2002. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 40:988-95.
37. de Viedma G. 2003. Rapid detection of resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review discussing molecular approaches. Clin Microbiol Infect;9: 349-359.
38. Franco-Alvarez de Luna, F., P. Ruiz, J. Gutierrez, and M. Casal. 2006. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for detection of Mycobacterium tuberculosis complex and four atypical mycobacterial species in clinical samples. J Clin Microbiol 44:3025-7.
39. [Rodriguez Díaz JC](#), [López M](#), [Ruiz M](#), [Royo G](#) In vitro activity of new fluoroquinolones and linezolid against non-tuberculous mycobacteria: [Int J Antimicrob Agents](#). 2003 Jun;21(6):585-8
40. Ding LW, Lai CC, Lee LN, and Hsuesh PR. 2005. Disease caused by non-tuberculous mycobacteria in a university hospital in Taiwan, 1997-2003. Epidemiol. Infect.,
41. Domenech, P., M. S. Jimenez, M. C. Menendez, T. J. Bull, S. Samper, A. Manrique, and M. J. Garcia. 1997. Mycobacterium mageritense sp. nov. Int J Syst Bacteriol 47:535-40.
42. Drake, T. A., J. A. Hindler, O. G. Berlin, and D. A. Bruckner. 1987. Rapid identification of Mycobacterium avium complex in culture using DNA probes. J Clin Microbiol 25:1442-5.
43. Drosten, C., M. Panning, and S. Kramme. 2003. Detection of Mycobacterium tuberculosis by real-time PCR using pan-mycobacterial primers and a pair of fluorescence resonance energy transfer probes specific for the M. tuberculosis complex. Clin Chem 49:1659-61.
44. Drobniowski FA, Watterson SA, Wilson SM and Harris GS.2000. A clinical, microbiological and economic analysis of a national service for the rapid molecular diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis. J Med Microb 49, 271-278.



45. Dye, C., M. A. Espinal, C. J. Watt, C. Mbiaga, and B. G. Williams. 2002. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis* 185:1197-202.
46. Ekeburg PB, Buadu EO, Starck P, Sarinas PSA, Chitkara RK, and Kushner WG. 2000. Clinical and Chest Radiographic Findings Among Persons With Sputum Culture Positive for *Mycobacterium gordonae*. *Chest*; 117:96-102.
47. Ellis SM, and Hansell DM. 2002. Imaging of Non-Tuberculous Mycobacterial Pulmonary Infection. *Clinical Radiology* 57: 661-669.
48. EMBL. 2008. [www.ebi.ac.uk/embl](http://www.ebi.ac.uk/embl)
49. Esparcia O, Navarro F, Quer M, and Coll P. 2008. Lymphadenopathy Caused by *Mycobacterium colombiense*. *JCM* p.1885-1887.
50. Espinal MA. 2003. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis* 83, 44-51.
51. Fabry W, Schmid EN, Ansorg R Comparison of the E test and a proportion dilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium kansasii*. *Chemotherapy*. 1995 Jul-Aug;41(4):247-52.
52. [Fabry W](#), [Schmid EN](#), [Ansorg R](#). Comparison of the E test and a proportion dilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex [J Med Microbiol](#). 1996 Mar;44(3):227-30.
53. Falkinham J. 1996. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *CMR*, p. 177-215.
54. Fernandez-Roblas R, Esteban J, Cabria F, Lopez HC, Jimenes MS, and Soriano F. 2000. In vitro Susceptibilities of Rapidly Growing Mycobacteria to Telithromycin (HMR 3647) and Seven Other Antomicrobials. *AAC*, p.181-182.
55. Flynn CM, Kelly CM, Barret MS, and Jones RN. 1997. Application of the Etest to the Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium marinum* Clinical Isolates. *JCM*, p.2083-2086.
56. Gamboa, F., G. Fernandez, E. Padilla, J. M. Manterola, J. Lonca, P. J. Cardona, L. Matas, and V. Ausina. 1998. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 36:684-9.
57. Garcia-Quintanilla, A., L. Garcia, G. Tudo, M. Navarro, J. Gonzalez, and M. T. Jimenez de Anta. 2000. Single-tube balanced heminested PCR for detecting

*Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative samples. *J Clin Microbiol* 38:1166-9.

58. Garcia-Quintanilla, A., J. Gonzalez-Martin, G. Tudo, M. Espasa, and M. T. Jimenez de Anta. 2002. Simultaneous identification of *Mycobacterium* genus and *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR. *J Clin Microbiol* 40:4646-51.

59. Garrigo M, Aragon LM, Alcaide F, Borrel S, Cardenosa E, Galan JJ, Gonzales-Martin J, Martin-Casabona N, Moreno C, Salvado M, and Coll P. 2007. Multicenter Laboratory Evaluation of the MB/BacT *Mycobacterium* Detection System and the BACTEC MGIT 960 System in Comparison with the BACTEC 460TB System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium Tuberculosis*. *JCM*,p. 1766-1770.

60. GenBank. 2008.

[www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide&itool=toolbar](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide&itool=toolbar)

61. Gil-Setas A, Torroba L, Fernandez JL, Martinez-Artola V, and Olite J. 2004. Evaluation of the MB/BacT system compared with Middlebrook 7H11 and Lowenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 224-228.

62. Gingeras, T. R., G. Ghandour, E. Wang, A. Berno, P. M. Small, F. Drobniewski, D. Alland, E. Desmond, M. Holodniy, and J. Drenkow. 1998. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res* 8:435-48.

63. Gitti, Z., I. Neonakis, G. Fanti, F. Kontos, S. Maraki, and Y. Tselentis. 2006. Use of the GenoType *Mycobacterium* CM and AS assays to analyze 76 nontuberculous mycobacterial isolates from Greece. *J Clin Microbiol* 44:2244-6.

64. Goessens, W. H., P. de Man, J. G. Koeleman, A. Luijendijk, R. te Witt, H. P. Endtz, and A. van Belkum. 2005. Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 43:2563-6.

65. Goldblat MR, Ribes JA. 2002. *Mycobacterium mucogenicum* Isolated From a Patient With Granulomatous Hepatitis. *Arch of Path and Lab Med*: 126/73-75.

66. Goto, M., S. Oka, K. Okuzumi, S. Kimura, and K. Shimada. 1991. Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *J Clin Microbiol* 29:2473-6.

67. Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ. 1993. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis*, 147(5): 1271-8
68. J. Grosset, P. Hauduroy, M. Langerova, H. T. Mahler, G. Meissner, D. A. Mitchison, and L. Sula. 1963. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance. *Bull World Health Organ* 29:565-78.
69. Remedios Guna<sup>1,2</sup>, Carlos Muñoz<sup>1</sup>, Victoria Domínguez<sup>1</sup>, Ángeles García-García<sup>2</sup>, Jorge Gálvez<sup>2</sup>, Jesús-Vicente de Julián-Ortiz<sup>2</sup> and Rafael Borrás<sup>1,\*</sup> In vitro activity of linezolid, clarithromycin and moxifloxacin against clinical isolates of *Mycobacterium kansasii*
70. Hale YM, Pfyffer GE, and Sellinger M. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *CID* 2001: 33:834-46.
71. Hall, L., K. A. Doerr, S. L. Wohlfiel, and G. D. Roberts. 2003. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 41:1447-53.
72. Harmsen, D., J. Rothganger, M. Frosch, and J. Albert. 2002. RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms Database. *Nucleic Acids Res* 30:416-7.
73. Healy, M., J. Huong, T. Bittner, M. Lising, S. Frye, S. Raza, R. Schrock, J. Manry, A. Renwick, R. Nieto, C. Woods, J. Versalovic, and J. R. Lupski. 2005. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 43:199-207.
74. Heifets L. Quantitative cultures and drug susceptibility testing of *Mycobacterium avium* clinical isolates before and during the antimicrobial therapy. 11<sup>th</sup> Forum in microbiology.
75. Heifets L. Mycobacteriology laboratory, *Clin Chest Med.*, 1997.
76. Heifets L, Mor N, Vander Kolk J, Mycobacterium avium strains resistant to clarythromycin and azythromycin, *AAC*, 1993 37(11):2364-70
77. Henry MT, Inamar L, O'riordan D, Schweiger M, Watson JP. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response *Eur Respir J* 2004: 23: 741-746.
78. Hilleman D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, and Niemann S. Use of the GenoType MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates.

79. Hillemann, D., S. Rusch-Gerdes, and E. Richter. 2007. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 45:2635-40.
80. Hoffner SE, Klintz L, Olson-Liljequist, and Bolmstrom A. 1994. Evaluation of Etest for Rapid Susceptibility Testing of *Mycobacterium chelonae* and *M. fortuitum*. *JCM* p.1846-1849.
81. Hoffner SE, Hjelm U, and Kalenius G. 1993. Susceptibility of *Mycobacterium mageritense* to Antibacterial Drugs and Drug Combinations. *AAC* p. 1285-1288.
82. Honore, N., and S. T. Cole. 1994. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 38:238-42.
83. Hornick DB, Dayton CS, Bedell GN, and Fick RB. Nontuberculous mycobacterial lung disease. Substantiation of a less aggressive approach. *Ghest* 1988;93:550-555.
84. Jason A. Jarzembowski, MD, PhD; Michael B. Young, MD Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine: Vol. 132, No. 8, pp. 1333–1341*
85. Johansen, I. S., B. Lundgren, A. Sosnovskaja, and V. O. Thomsen. 2003. Direct detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens in low- and high-incidence countries by line probe assay. *J Clin Microbiol* 41:4454-6.
86. Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35:907-14.
87. Kanavaki S, Mantadakis E, Nikolaou S, Papavassiliou A, Karambella S, Anagnostou S, Falagas M, Samonis G. 2006. Resistance of *Mycobacterium Tuberculosis* isolates in different populations in Greece during 1993-2002. *Int J Tuberc Lung Dis.* 10(5):559-564.
88. Kanavaki S, Mantadakis E, Nikolaou S, Karambella S, Samonis G. 2007. Antimicrobial resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from children in Greece, 1994-2004. *Int J Tuberc Lung Dis.* 11(4):424-428.
89. Kang PB, Azad AK, Torreles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, DesJardin LE, Schlesinger L. 2005. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis, *JEM*, vol 202, No 7.

90. Kasperbauer SH, and Daley CL. Diagnosis and Treatment due to Mycobacterium Avium Complex. 2008. *Semin Respir Crit Care Med*, 29(5): 569-76
91. Kennedy MP, O'Connor TM, Sheen S, Cryan B, Bredin C. 2003. Nontuberculous mycobacteria: incidence in Southwest Ireland from 1987 to 2000. *Respir Med*, 97(3): 257-63.
92. Kim, B. J., K. H. Lee, B. N. Park, S. J. Kim, E. M. Park, Y. G. Park, G. H. Bai, S. J. Kim, and Y. H. Kook. 2001. Detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis in sputa by nested PCR-linked single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing. *J Clin Microbiol* 39:2610-7.
93. Kim, B. J., S. H. Lee, M. A. Lyu, S. J. Kim, G. H. Bai, G. T. Chae, E. C. Kim, C. Y. Cha, and Y. H. Kook. 1999. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). *J Clin Microbiol* 37:1714-20.
94. Kim, S. Y., Y. J. Park, W. I. Kim, S. H. Lee, C. Ludgerus Chang, S. J. Kang, and C. S. Kang. 2003. Molecular analysis of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47:497-502.
95. Kim, S. Y., Y. J. Park, E. Song, H. Jang, C. Kim, J. Yoo, and S. J. Kang. 2006. Evaluation of the CombiChip Mycobacteria Drug-Resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in Mycobacterium tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 54:203-10.
96. Kirschner, P., J. Rosenau, B. Springer, K. Teschner, K. Feldmann, and E. C. Bottger. 1996. Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18-month prospective study. *J Clin Microbiol* 34:304-12.
97. Koh WJ, Kivon OJ, Jeon K, Kim TS, Lee KS, Park YKP, and Bai GH. 2006. Clinical Significance of Nontuberculous Mycobacteria Isolates From Respiratory Specimens in Korea. *Chest* 129:341-348.
98. Koontz FP, Erwin ME, Barret MS, and Jones RN. 1994. Etest for Routine Clinical Antimicrobial Susceptibility Testing of Rapid-Growing Mycobacteria Isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 19:183-186.
99. Kox, L. F., J. van Leeuwen, S. Knijper, H. M. Jansen, and A. H. Kolk. 1995. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 33:3225-33.
100. Kremer, K., D. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. Hermans, C. Martin, P. Palittapongarnpim, B. B. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakrus, J. M.

Musser, and J. D. van Embden. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 37:2607-18.

101. Lacombe A, Garcia-Sierra N, Prat C, Ruiz-Mancano J, Haba L, Roses S, Maldonado J, and Dominques J. 2008. GenoType MTBDRPlus Assay for Molecular Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Strains and Clinical Samples. *JCM*, 46/3660-3667.

102. Lantzardo M, Ashkin, 2000. Physiology at the dawn of the new century. *Chest*, 117.

103. Lebrun L, Onody C, Vincent V, and Nordman P. 1996. Evaluation of the Etest for rapid susceptibility testing of Mycobacterium avium to clarithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37,999-1003.

104. Louro AP, Waites KB, Georgescu E, and Benjamin WH. 2001. Direct Identification of Mycobacterium avium Complex and Mycobacterium gordonae from MB/BacT Bottles Using Accuprobe. *JCM*, p.570-573.

105. Macedo R, Amorim A, Pereira E. Multidrug-resistant tuberculosis: rapid molecular detection with MTBDRplus assay in clinical samples. *Rev.Port Pneumol*. 2009 15(3):353-65

106. Makinen J, Sarkola A, Marjamaki M, Viljanen M, and Soini H, 2002, Evaluation of GenoType and LiPA MYCOBACTERIA Assays for Identification of Finnish Mycobacterial Isolates. *JCM*, p. 3478-3481.

107. Marras TK, Daley CL. 2002. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med*. 23(3):553-67.

108. Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen AR, Thomsen O, Curcio M, Fauville-Dufaux M, Feldman K, Haverkova M, Katila M-L, Koksalan M, Pereira MF, Rodrigues F, Pfyffer GE, Portaels F, Urgell JR, Rusch-Gerdes S, Tortoli E, Vincent V, Wat B. Non tuberculous mycobacteria: pattern of isolation. A multi-country retrospective study. 2004. *Int J Tuberc Lung Dis* 8(10):1186-1193.

109. Masaki T, Ohkusu K, Hata H, Fujiwara N, Lihara H, Yamada-Noda M, Nhung PH, Hayash M, Asano Y, Kawamura Y, and Ezaki T. 2006. Mycobacterium kumamotoense sp. nov. Recovered from Clinical Specimens and the First Isolation Report of Mycobacterium arupense in Japan: Novel Slowly Growing, Nonchromogenic Clinical Isolates Related to Mycobacterium terrae Complex.

110. McHugh, T. D., C. F. Pope, C. L. Ling, S. Patel, O. J. Billington, R. D. Gosling, M. C. Lipman, and S. H. Gillespie. 2004. Prospective evaluation of

BDProbeTec strand displacement amplification (SDA) system for diagnosis of tuberculosis in non-respiratory and respiratory samples. *J Med Microbiol* 53:1215-9.

111. Meier, A., P. Kirschner, F. C. Bange, U. Vogel, and E. C. Bottger. 1994. Genetic alterations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38:228-33.

112. Mijs, W., K. De Vreese, A. Devos, H. Pottel, A. Valgaeren, C. Evans, J. Norton, D. Parker, L. Rigouts, F. Portaels, U. Reischl, S. Watterson, G. Pfyffer, and R. Rossau. 2002. Evaluation of a commercial line probe assay for identification of mycobacterium species from liquid and solid culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21:794-802.

113. Miller, L. P., J. T. Crawford, and T. M. Shinnick. 1994. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:805-11.

114. Moore, D. A., C. A. Evans, R. H. Gilman, L. Caviedes, J. Coronel, A. Vivar, E. Sanchez, Y. Pinedo, J. C. Saravia, C. Salazar, R. Oberhelman, M. G. Hollm-Delgado, D. LaChira, A. R. Escombe, and J. S. Friedland. 2006. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med* 355:1539-50.

115. Moore, D. F., and J. I. Curry. 1998. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 36:1028-31.

116. Morgan, M., S. Kalantri, L. Flores, and M. Pai. 2005. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 5:62.

117. Mun, H. S., H. J. Kim, E. J. Oh, H. Kim, Y. G. Park, G. H. Bai, J. Do, C. Y. Cha, Y. H. Kook, and B. J. Kim. 2007. Direct application of *Ava*II PCR restriction fragment length polymorphism analysis (*Ava*II PRA) targeting 644 bp heat shock protein 65 (*hsp65*) gene to sputum samples. *Microbiol Immunol* 51:105-10.

118. Munoz M, Raynaud C, Laneelle MA, Julian E, Martin LMM, Silve G, Ausina V, Daffe M, and Luquin M. 1998. Seroactive species-specific lipoligosaccharides of *Mycobacterium mucogenicum* sp.nov. (formerly *Mycobacterium chelonae*-like organism): identification and chemical characterization. *Microbiology* 144, 137-148.

119. Murcia MI, Tortolli E, Menendez MC, Palenque E, and Garcia MJ. 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium*

avium complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J of Syst and Evol Microb*, 56, 2049-2054.

120. Murcia-Tranquen MI, Gomez-Manoz E, Alvarado FS, Bustillo JC, de Mendivison E, 2001, Frequency of TB and non TB mycobacteria in HIV infected patients from Bogota, *BMC Infect D*.

121. Musial, C. E., L. S. Tice, L. Stockman, and G. D. Roberts. 1988. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis complex. *J Clin Microbiol* 26:2120-3.

122. Nathanson E., Lambregts-van Weezenbeek C, Rich ML, Gupta R, Bayona J, Blondal K, Caminero JA, Cegielski JP, Danilovits M, Espinal MA, Hollo V, Jaramillo E, Leimane V, Mitnick CD, Muckherjee JS, Nunn P, Pasechnikov A, Tupasi T, Wells C, Raviglione MC. Multidrug-resistant tuberculosis management in resource-limited settings. 2006, *Emerg. Infect Dis*;12(9):1389-97.

123. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003). *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes: Approved Standard M24-A*. NCCLS, Wayne, PA, USA.

124. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2004). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fourteenth Informational Supplement: Approved Standard M100-S14*. NCCLS, Wayne, PA, USA.

125. Neeley SP, Denning DW. 1989. Cutaneous Mycobacterium thermoresistibile infection in a heart transplant recipient. *Rev Infect Dis*, 11(4):608-611.

126. Nelson SM, Deike MA, and Cartwright CP. 1998. Value of Examining Multiple Sputum Specimens in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. p.467-469.

127. Neonakis, I. K., Z. Gitti, M. Baritaki, I. S. Kourbeti, S. Baritaki, E. Petinaki, S. Maraki, E. Krambovitis, and D. A. Spandidos. 2007. Resistance status of Mycobacterium tuberculosis on the island of Crete, Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:607-9.

128. Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA, [Molecular diagnostic tools in mycobacteriology](#). *J Microbiol Methods*. 2008 Sep;75(1):1-11. Epub 2008 Jul 2. Review. PMID: 18599139

129. Neonakis, I. K., Z. Gitti, E. Petinaki, S. Maraki, and D. A. Spandidos. 2007. Evaluation of the GenoType MTBC assay for differentiating 120 clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:151-2.



130. Nolte, F. S., B. Metchock, J. E. McGowan, Jr., A. Edwards, O. Okwumabua, C. Thurmond, P. S. Mitchell, B. Plikaytis, and T. Shinnick. 1993. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 31:1777-82.
131. Norman E. Et all, BAL is better than gastric lavage, *Scan J.Inf.Dis.*1988.
132. O'Brien D, Currie B, and Krause VL. 2000. Nontuberculous Mycobacterial Disease in Northern Australia: A Case Series and Review of the Literature. *CID*, 31:958-968.
133. Padilla E, Gonzales V, Manterola JM, Perez A, Quesada MD, Gordillo S, Vilaplana C, Pallares MA, Molinos S, Sanchez MD, and Ausina V. 2004. Comparative Evaluation of the New Version of the INNO-LiPA Mycobacteria and GenoType Mycobacterium Species from MB/BacT Liquid Cultures artificially Inoculated with Mycobacterial Strains. *JCM*,3083-3088.
134. Pai, M., S. Kalantri, L. Pascopella, L. W. Riley, and A. L. Reingold. 2005. Bacteriophage-based assays for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis. *J Infect* 51:175-87.
135. Patel, J. B., D. G. Leonard, X. Pan, J. M. Musser, R. E. Berman, and I. Nachamkin. 2000. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *J Clin Microbiol* 38:246-51.
136. Perkins MD. 2000. New diagnostic tools for tuberculosis *Int J Tuberc Lung Dis* 4(12): 5182-5188.
137. Pfyffer, G. 2003. Laboratory diagnosis of tuberculosis. Karger, Basel.
138. Pfyffer, G. E., P. Kissling, R. Wirth, and R. Weber. 1994. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. *J Clin Microbiol* 32:918-23.
139. Pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium-intracellulare* in HIV-negative patients: five-year follow-up of patients receiving standardised treatment. *Int J Tuberc Lung Dis*,2002, Jul;6(7):628-34
140. Piatek, A. S., A. Telenti, M. R. Murray, H. El-Hajj, W. R. Jacobs, Jr., F. R. Kramer, and D. Alland. 2000. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 44:103-10.
141. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Tosi CP, Nista D, Bornigia S, Scagnelli M, Rigon A, Ruggerio G, and Godlio A. 2001. Comparison of

MB/BacT ALERT 3D System and Lowenstein-Jensen Medium for Recovery and Identification of Mycobacteria from Clinical Specimens: a Multicenter Study. JCM, p.6651-657.

142. Piersimoni, C., and C. Scarparo. 2003. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples. J Clin Microbiol 41:5355-65.

143. Piersimoni, C., C. Scarparo, P. Piccoli, A. Rigon, G. Ruggiero, D. Nista, and S. Bornigia. 2002. Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex from respiratory and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol 40:4138-42.

144. Piersimoni C, Olivieri A, Benacchio L, and Scarpio C.2006. Current Perspective on Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis Complex: the Automated Nonradiometric Systems. JCM, p.20-28.

145. Primm TP, Lucero CA, and Fakinham JO. 2004. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. CMR p.98-106.

146. Ramaswamy, S., and J. M. Musser. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuberc Lung Dis 79:3-29.

147. Raviglione, M. C., D. E. Snider, Jr., and A. Kochi. 1995. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. Jama 273:220-6.

148. Reisner, B. S., A. M. Gatson, and G. L. Woods. 1994. Use of Gen-Probe AccuProbes to identify Mycobacterium avium complex, Mycobacterium tuberculosis complex, Mycobacterium kansasii, and Mycobacterium gordonae directly from BACTEC TB broth cultures. J Clin Microbiol 32:2995-8.

149. [Rhomberg PR](#), [Jones RN](#). In vitro activity of 11 antimicrobial agents, including gatifloxacin and GAR936, tested against clinical isolates of Mycobacterium marinum: [Diagn Microbiol Infect Dis](#). 2002 Feb;42(2):145-7

150. Richter, E., S. Rusch-Gerdes, and D. Hillemann. 2006. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for identification of mycobacterial species from cultures. J Clin Microbiol 44:1769-75.

151. Richter, E., M. Weizenegger, S. Rusch-Gerdes, and S. Niemann. 2003. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol 41:2672-5.

152. Richter E, Weizenegger M, Fahr AM, and Rusch-Gerdes S.2004. Usefulness of the GenoType MTBC Assay for Differentiating Species of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Cultures Obtained from Clinical Specimens. JCM, p.4303-4306.
153. Ringuet, H., C. Akoua-Koffi, S. Honore, A. Varnerot, V. Vincent, P. Berche, J. L. Gaillard, and C. Pierre-Audigier. 1999. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 37:852-7.
154. Rossau, R., H. Traore, H. De Beenhouwer, W. Mijs, G. Jannes, P. De Rijk, and F. Portaels. 1997. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother 41:2093-8.
155. Roth, A., M. Fischer, M. E. Hamid, S. Michalke, W. Ludwig, and H. Mauch. 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J Clin Microbiol 36:139-47.
156. Ruddy MC, Davies AP, Yates MD, Yates S, Balasegaram S, Drabu Y, Patel B, Lozewicz S, Sen S, Bahl M, James E, Lipman M, Duckworth G, Watson JM, Piper M, Drobniowski FA, and Maguire.2004. Outbreak of isoniazid resistant tuberculosis in north London. Thorax 59; 279-285.
157. Ruddy M, Balabanova Y, Graham C, Fedorin I, Malomanova N, Elisarova E, Kuznetznov S, Gusarova G, Zakharova S, Melentyev A, Krukova E, Golishevskaya V, Erokhin V, Dorozhkova, and Drobniowski. 2005. Rates of drug resistance and risk factor analysis in civilian and prison patients with tuberculosis in Samara Region, Russia.
158. Ruiz P, Gutierrez J, Zerolo FI, and Casal M. 2002. GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species Isolated from Human Clinical Samples by Using Liquid Medium. JCM, p.3076-3078.
159. Ruiz, M., M. J. Torres, A. C. Llanos, A. Arroyo, J. C. Palomares, and J. Aznar. 2004. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis in auramine-rhodamine-positive sputum specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol 42:1585-9.
160. Rushton SP, Goodfellow M, O'Donnell AG, and Magee IG. 2006. The epidemiology of atypical mycobacterial diseases in northern England: a space-time clustering and Generalized Linear Modelling approach. Epidemiol. Infect. P.1-10.

161. Russo, C., E. Tortoli, and D. Menichella. 2006. Evaluation of the New GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 44:334-9.
162. Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Nista D, and Piersimoni C. 2001. Direct Identification of Mycobacteria from MB/BacT Alert 3D Bottles: Comparative Evaluation of Two Commercial Probe Assays. *JCM*, p.3222-3227.
163. Seagar AL, Prendergast C, Emmanuel FH, Rayner A, Thomson S, and Laurenson IF. 2008. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for the simultaneous detection of the Mycobacterium tuberculosis complex and four atypical mycobacterial species in smear-positive respiratory specimens. *J Med Microbiol* 57/605-611.
164. Sekigushi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska S, Kirikae F, Toyota E, Kobayashi I, Morita K, Kudo K, Kato S, Kuratsuji T, Mori T, and Kirikae T. 2007. Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. *JCM*, p.179-192.
165. Sharma, M., S. Sethi, B. Mishra, C. Sengupta, and S. K. Sharma. 2003. Rapid detection of mutations in rpoB gene of rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis strains by line probe assay. *Indian J Med Res* 117:76-80.
166. Sharma, S. K., and A. Mohan. 2004. Multidrug-resistant tuberculosis. *Indian J Med Res* 120:354-76. 96. Russo, C., E. Tortoli, and D. Menichella. 2006. Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 44:334-9.
167. Smith I. 2003. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *CMR*, p.463-496.
168. Soini, H., and J. M. Musser. 2001. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem* 47:809-14.
169. Soini, H., M. Skurnik, K. Liippo, E. Tala, and M. K. Viljanen. 1992. Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-kilodalton protein. *J Clin Microbiol* 30:2025-8.
170. Somoskovi, A., J. Dormandy, D. Mitsani, J. Rivenburg, and M. Salfinger. 2006. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the Mycobacterium tuberculosis complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. *J Clin Microbiol* 44:4459-63.
171. Springer B, Bottger E, Kirschner P, and Wallace R. 1995. Phylogeny of the Mycobacterium chelonae-Like Organism Based on Portal Sequence of the 16S

rRNA Gene and Proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *Int J of System Bacteriol*, p.262-267.

172. Springer, B., L. Stockman, K. Teschner, G. D. Roberts, and E. C. Bottger. 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 34:296-303.

173. Springer B, Tortoli E, Richter I, Grunewald R, Rush-Gedes S, Uschmann K, Suter F, Collins MD, Kroppensedt RM, and Bottger E. 1995. *Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a New Species Isolated from Patient with Disseminated Infections. *JCM*, p.2805-2811.

174. Stager CE, Libonati JP, Siddiqi SH, Davis JR, Hooper NM, Baker JF, and Carter ME. 1991. Role of Solid Media When Used in Conjunction with the BACTEC System for Mycobacterial Isolation and Identification. *JCM*, p.154-157.

175. Stauffer, F., R. Mutschlechner, P. Hasenberger, S. Stadlbauer, and H. Schinko. 1995. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens by a commercial polymerase chain reaction kit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:1046-51.

176. Steingrube, V. A., J. L. Gibson, B. A. Brown, Y. Zhang, R. W. Wilson, M. Rajagopalan, and R. J. Wallace, Jr. 1995. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 33:149-53.

177. Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, and D. van Soolingen. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44:4498-510.

178. Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel, and C. Locht. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 36:762-71.

179. Swenson JM, Wallace R, Selcox VA, and Thornsberry C. 1985. Antimicrobial Susceptibility of Five Subgroups of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. *AAC*, p.805-811.

180. Telenti, A., N. Honore, C. Bernasconi, J. March, A. Ortega, B. Heym, H. E. Takiff, and S. T. Cole. 1997. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin

resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J Clin Microbiol* 35:719-23.

181. Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Bottger, and T. Bodmer. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 31:175-8.

182. Tortoli, E., M. T. Simonetti, and F. Lavinia. 1996. Evaluation of reformulated chemiluminescent DNA probe (AccuProbe) for culture identification of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol* 34:2838-40.

183. Tortoli, E., M. Tronci, C. P. Tosi, C. Galli, F. Lavinia, S. Natili, and A. Goglio. 1999. Multicenter evaluation of two commercial amplification kits (Amplicor, Roche and LCx, Abbott) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 33:173-9.

184. Tortoli E, Bartoloni A, Erba ML, Levre E, Lombardi N, Mantella A, and Mecocci L. 2002. Human Infection Due to *Mycobacterium lentiflavum*. *JCM*, p.728-729.

185. Tortoli, E., A. Mariottini, and G. Mazzarelli. 2003. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol* 41:4418-20.

186. Tortoli, E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 16:319-54.

187. Tortoli E, 2004. Clinical Features of Infections Caused by New Nontuberculous Mycobacteria, Part I *Clinical Microbiology Newsletter*, 26/12.

188. Tortoli, E., and F. Marcelli. 2007. Use of the INNO LiPA Rif.TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:51-5.

189. Traore, H., A. van Deun, I. C. Shamputa, L. Rigouts, and F. Portaels. 2006. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA and rifampin resistance in clinical specimens from tuberculosis patients by line probe assay. *J Clin Microbiol* 44:4384-8.

190. Turenne C, Chedore P, Wolfe J, Jamieson F, May K, Kabani A. 2002. Phenotypic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of *Mycobacterium elephantis* from Human Specimens. *JCM*, p.1230-1236.

191. Vargas J, Gamboa C, Negrin D, Correa M, Sandova C, Aguar A, Prieto M, Rodrigues-Morales AJ, Waard J, and Yakrus M. 2005. Disseminated Mycobacterium mucogenicum Infection in a Patient with Idiopathic CD4+T Lymphocytopenia Manifesting as Fever of Unknown Origin. CID, 41;759-760.
192. [van Ingen J](#), [Bendien SA](#), [de Lange WC](#), [Hoefsloot W](#), [Dekhuijzen RP](#), [Boeree MJ](#), [van Soolingen D](#). The clinical relevance of nontuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, the Netherlands Thorax 2009 Feb 12
193. Vera-Cabrera L,<sup>1\*</sup> Barbara A. Brown-Elliott,<sup>2</sup> Richard J. Wallace Jr.,<sup>2</sup> Jorge Ocampo-Candiani,<sup>1</sup> Oliverio Welsh,<sup>1</sup> Sung Hak Choi,<sup>3</sup> and Carmen A. Molina-Torres<sup>1</sup> Activities of the Novel Oxazolidinones DA-7867 and DA-7157 against Rapidly and Slowly Growing Mycobacteria
194. Vincent V, Brown-Eliot B, Jost J, Wallace R. 2003. *Mycobacterium*: phenotypic and genotypic identification, p 560-584. In P.R. Murray et al. (eds) Manual of clinical microbiology, 8<sup>th</sup> ed., ASM Press. Washington DC.
195. Wallace RJ, Swenson JM, Silcox VA, and Good RC. 1982. Disc Diffusion Testing with Polymyxin and Amikacin for Differentiation of Mycobacterium fortuitum and mycobacterium chelonae. JCM, p.1003-1006.
196. Wallace, R. J., Jr, Nash, D. R., Steele, L. C. *et al.* (1986). Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth. *Journal of Clinical Microbiology* **24**, 976–81
197. Wallace RJ, Brown BA, and Only GO. 1993. Susceptibilities of Mycobacterium fortuitum biovar. fortuitum and the Two Subgroups of Mycobacterium chelonae to Imipenem, Cemetazole, Cefoxitin, and Amoxicillin-Clavulanic Acid. AAC, p.773-775.
198. Richard J. Wallace Jr.,<sup>\*</sup> Barbara A. Brown-Elliott, Christopher J. Crist, Linda Mann, and Rebecca W. Wilson. 2002. Comparison of the In Vitro Activity of the Glycylcycline Tigecycline (Formerly GAR-936) with Those of Tetracycline, Minocycline, and Doxycycline against Isolates of Nontuberculous Mycobacteria AAC.46.10.3164-3167.
199. Walton C, Hawkey PM, and James VLA. 2005. Examinations of specimens for mycobacteria in clinical laboratories in 21 countries: a 10-year review of the UK National Quality Assessment Scheme for Mycobacteria Culture. CMI, 11/1016.

200. Wang SX, and Tay L. 1999. Evaluation of Three Nucleic Acid Amplification Methods for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Respiratory Specimens. JCM, p.1932-1934.
201. Watt B. 1997. In vitro sensitivity and treatment of less common mycobacteria. AAC, 39; 567-574.
202. Watterson SA, and Drobniowski FA. 2000. Modern Laboratory Diagnosis of Mycobacterial Infections. J Clin. Pathol. 53; 727-732.
203. [Werngren J](#), [Olsson-Liljequist B](#), [Gezelius L](#), [Hoffner SE](#) Antimicrobial susceptibility of Mycobacterium marinum determined by E-test and agar dilution Scand 2001;33(8):585-8.
204. WHO. 2000. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Prevalence and trends. Report no 2. . WHO/CDC/TB/2000.278, Geneva.
205. WHO. 2001. Global tuberculosis control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
206. (WHO/HTM/TB/2006,362)
207. Woods GI. 2000. Susceptibility Testing for Mycobacteria. CID, 31;1209-15
208. Woods GI, 2001. Molecular techniques in mycobacterial detection. Arch Pathol Lab Med, 125(1):122-6.
209. Zaki MS, and Hassan SA. 2008. Clinical Evaluation of Gen-Probe's Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for Rapid Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in Egypt Children at Risk for Infection. vol.132
210. Zhang, M., J. Yue, Y. P. Yang, H. M. Zhang, J. Q. Lei, R. L. Jin, X. L. Zhang, and H. H. Wang. 2005. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from China. J Clin Microbiol 43:5477-82.



