

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Mycobacterium Tuberculosis* İZOLATLARININ 24 LOKUS  
MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNITS  
VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS(MIRU –  
VNTR)YÖNTEMİ İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ**

**MAHDİ MARZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI  
PROF. DR. FATİH KÖKSAL**

**ADANA - 2012**

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Mycobacterium Tuberculosis* İZOLATLARININ 24 LOKUS  
MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNITS  
VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS(MIRU –  
VNTR)YÖNTEMİ İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ**

**MAHDİ MARZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI  
PROF. DR. FATİH KÖKSAL**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
TF2011YL6 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

**ADANA - 2012**

## TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalanma imkânı bulduğum, beni her konuda sabırla destekleyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof Dr. Fatih KÖKSAL'a, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli bölüm hocalarım Sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN, Sayın Prof. Dr. Akgün YAMAN ve Sayın Prof. Dr. Macit İLKİT'e, yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan kıvanç duyduğum başta Sayın Dr. Begüm KAYAR olmak üzere, Dr. Taylan BOZOK, Gülfer YAKICI, tüm tüberküloz çalışma grubu ve Ç.Ü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma, eğitimim boyunca hiçbir yardımı esirgemeyen bölüm sekreterimiz Sn. Suna GÖKMEN ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarının değerli çalışanlarına, Enstitü sekreterimiz Sn. Ferhat DİKEL ve öğrenci işleri sorumlusu Sn. Kader ORDU başta olmak üzere tüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ve özellikle eğitim dönemimde beni sabırla her konuda destekledikleri için babam Fakhraddin MARZİ, annem Khavar SHERZAVANİ ve kardeşlerim Mahsa MARZİ ve Sahar MARZİ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mahdi MARZİ

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEŞEKKÜR</b>	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iv
<b>TABLO DİZİNİ</b>	vi
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b>	vii
<b>KISALTMALAR</b>	viii
<b>ÖZET</b>	ix
<b>ABSTRACT</b>	x
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Tüberkülozun Epidemiyolojisi	6
2.3. Mikobakteriler ve Sınıflandırılması	9
2.4. Mikobakterilerin Tanısında ve Duyarlılıklarının Belirlenmesinde	
Kullanılan Yöntemler	13
2.4.1. Örneklerin İşlenmesi	14
2.4.2. Mikroskopik inceleme	14
2.4.3. Kültür yöntemleri	15
2.4.4. Duyarlılık Testleri	16
2.4.5. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)	16
2.4.5.1. In-house PZT	18
2.5. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	18
2.5.1. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Fenotipik Yöntemler	19
2.5.2. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Genotipik Yöntemler	20
2.5.2.1. Kromozomal DNA Analizi	20
2.5.2.2. PZT bazlı tiplendirme yöntemleri	20
2.5.2.2.1. PZT bazlı bölgeye özgül RFLP	21
2.5.2.2.2. Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA	21

4.5.2.3. DNA dizi analizi	21
2.6. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler	22
2.6.1. RFLP	23
2.6.1.1. Hibridizasyonbazlı RFLP	23
2.6.1.1.1. IS6110-RFLP	24
2.6.1.1.2. PGRS-RFLP	25
2.6.2. Spoligotipleme	25
2.6.3. <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i> (MIRU) – <i>Variable Numbers of Tandem Repeats</i> (VNTR)	26
2.6.4. <i>Exact Tandem Repeat</i> (ETR) – VNTR	28
2.6.5. 16S ve 23S rRNA	28
2.6.6. Rasgele çoğaltılan polimorfik DNA PZT	28
2.6.7. <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	29
2.7. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi Alt türlerinin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Yeri	29
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	32
3.1. Çalışma Grubu	32
3.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> İzolatlarının Moleküler Tiplendirilmesi	32
3.2.1. Mikobakterilerden Genomik DNA İzolasyonu	32
3.2.2. MIRU-VNTR ve ETR-VNTR gen bölgelerinin PZT ile Çoğaltılması	36
<b>4. BULGULAR</b>	39
<b>5. TARTIŞMA</b>	41
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	47
<b>KAYNAKLAR</b>	48

## TABLO LİSTESİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 3.1.</b> MGİT Tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları	33
<b>Tablo-2.</b> Primer dizisi	37

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı	11
Şekil 2. MIRU gen bölgesi dağılımı	28
Şekil 3. Mickle cihazı	35

## KISALTMA LİSTESİ

A	: Adenin
ARB	: Aside dirençli bakteri
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
BCG	: <i>Bacille Calmette-Guerin</i>
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
C	: Sitozin
CLSI	: <i>The Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ÇİD	: Çoklu ilaç direnci
ddF	: <i>Dideoksifingerprinting</i>
DGTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DR	: <i>Direct Repeat</i>
EMB	: Etambutol
ETR	: <i>Exact Tandem Repeat</i>
EZN	: Erlich Ziehl-Neelsen
FDA	: <i>Food and Drug Administration of the United States of America</i>
G	: Guanin
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPA	: <i>Hybridization Protection Assay</i>
INH	: İzoniazid
IS	: İnsersiyon sekansları
LJ	: Löwenstein-Jensen
MAC	: <i>Mycobacterium avium</i> kompleks
MIRU	: <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i> Mikobakteri tekrarlayan üniteleri
MPTR	: <i>Major Polymorphic Tandem Repeats</i>
NAA	: Nükleik Asit Amplifikasyonu
NALC	: N-Asetil-L-Sistein



NaOH	: Sodyum hidroksit
OT	: Old tüberkulin
PAS	: Para-aminosalisilik asit
PE	: Prolinglutamat
PFGE	: <i>PulsedField Gel Electrophoresis</i>
PGRS	: <i>Polymorphic GC-richSequences</i>
PPD	: Pürifiye protein derivelere
PPE	: Prolin-prolinglutamat
PZA	: Pirazinamid
PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
RAPD	: <i>RandomAmplifiedPolymorphic DNA</i>
RE	: Restriksiyon enzimi
RFLP	: <i>RestrictionFragmentLengthPolymorphism</i>
RIF	: Rifampisin
SDA	: <i>StrandDisplacementAmplification</i>
SSCP	: <i>Single-StrandConformationPolymorphism</i>
T	: Timin
TB	: Tüberküloz
TDM	: Tüberküloz Dışı Mikobakteriler
TMA	: <i>TranscriptionMediatedAmplification</i>
VNTR	: <i>VariableNumber Tandem Repeats</i>

## ÖZET

### ***Mycobacterium Tuberculosis* İZOLATLARININ 24 LOKUS MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNITS VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS(MIRU – VNTR)YÖNTEMİ İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Tüberkülozun az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki yüksek prevalansının yanı sıra HIV ile birlikte gelişmiş ülkelerde de yeniden artma trendine giren insidansı, en az 2 major ilaca dirençli (MDR) ve florokinolonlarla birlikte en az enjektatable minor ilaca dirençli (XDR) suşlarının ortaya çıkışları ve global yayılım gösterme eğilimleri M tuberculosis kontrol çalışmalarında moleküler düzeyde sürveyansın önemini artırmıştır. Bu çalışmada Ç.Ü Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi (THAUM) ve Bölge Tüberküloz laboratuvarına gönderilen akciğer tüberkülozu şüphesi olan hastalardan gönderilen balgam örneklerinden sıvı [BACTEC 960 TB (hızlı)] ve katı [Löwenstein Jensen Besiyeri (yavaş)] kültür ortamlarında üretilen ve ticari kart testler ile M.tuberculosis kompleksi ön tanısı alan M.tuberculosis izolatları MIRU-VNTR yöntemi ile genotiplendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler :M.tuberculosis, MIRU-VNTR, PCR**

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF GENOTYPIC CHARACTERISTICS BY 24 LOCUS MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNITS VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS (MIRU – VNTR) IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLATES.**

Less developed and developing countries with high prevalence of tuberculosis at the same time, the increase in active tuberculosis among people infected with both tuberculosis in developed country, emergence of the strains at least 2 major drug-resistant (MDR) and at least two minor injectable drugs with a fluoroquinolone drug-resistant (XDR), these strains have a tendency to expand, increase the importance of molecular surveillance for M tuberculosis control studies. In this study investigated the genotypic characteristics by MIRU-VNTR of M tuberculosis strains isolated from sputum samples from patients with suspected pulmonary tuberculosis by MGIT 960 and Lowenstein Jensen medium (JL)

**Keywords:** M. tuberculosis, Miru-VNTR, PCR

# 1. GİRİŞ

Akciğer tüberkülozu tarihin ilk çağlarından beri yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden bir halk sağlığı problemi olarak önemini hep korumuştur. Tüberküloz hakkındaki ilk bilimsel veriler Almanya’da bulunan ve MÖ. 8000 yılına dek uzanan tarih öncesi insana ait iskelet kalıntılarına aittir. Diğer taraftan M. Ö. 4000 - 2400’lü yıllarda Mısır’da firavunlar döneminden kalma Thebus bölgesindeki 85 mumyadan alınan organik materyalde basil bulunmuş spoligotiplleme ile sus tayini yapılmıştır<sup>1</sup>.

Günümüzde tüberküloz (TB), tüm dünyada yılda dokuz milyondan fazla yeni hasta, iki milyondan fazla ölüm sayısı ile, toplum sağlığını tehdit eden en önemli enfeksiyon hastalıklarından birisidir. Dünyada 2009 yılında 9 milyon yeni tüberküloz olgusu ortaya çıkmış ve 1.4 milyon insan bu hastalıktan ölmüştür<sup>2,3</sup>. Ölenlerin sayısı her gün 15 büyük uçak kazası veya 3 Titanik kazasında ölenlerin sayısına eşdeğerdir. Dünyada her geçen bir dakikada 3 kişi bu hastalıktan ölmektedir. Tüberküloz kadın ölümleri arasında 4.sırayı almaktadır. 1950’li yıllarda ülkemizde tüm ölüm nedenleri arasında ilk sırayı alan tüberküloz bugün 10’cu sırada yerini korumaktadır. Türkiye’de 1965 yılında tüberküloza yakalanma oranı yüz binde 172 iken bu oran bugün yüz binde 24’e düşmüştür. Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı’nın 2009 Türkiye Tüberküloz Raporu’na göre 2009 yılında dispanserlere kayıtlı tüberküloz olgu neredeyse on yedi bini bulmuştur ki bu olguların yaklaşık üçte biri İstanbul’dadır. İstanbul’da 2009 yılında yaklaşık beş bin yeni hasta tespit edilmiştir ve aldığı göçlerle özellikle dirençli “Beijing suşları” ile büyük tehlike altındadır<sup>3</sup>.

Tüberküloz, insan morbidite ve mortalitesinin tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir. TB, 15–49 yaşlar arasında tek bir enfeksiyöz hastalıktan ölüm nedenleri arasında ilk sıradadır. Bu hastalıkla ilişkili olarak, her yıl yaklaşık sekiz milyon yeni aktif olgu ve üç milyon ölüm rapor edilmektedir. Ülkemizde 2005 yılı verilerine göre TB insidansı yüz binde 26 olarak bildirilmiştir. Enfeksiyon prevalansı da %25 olarak belirlenmiştir. Ülkemizde; TB vakalarının büyük bir kısmı genç nüfusta görülürken, kadınlara göre erkeklerde 2,5 kat daha fazla enfeksiyon gelişmektedir<sup>4</sup>.

Halk sağlığını ilgilendiren diğer enfeksiyon hastalıklarında olduğu gibi TB'da dakoronma önlemleri en az tedavi kadar önemlidir. Korunma önlemlerinin alınmasında gerekli stratejilerin belirlenmesi için bulaş kaynaklarının ve salgınların ortaya çıkarılması gerekmektedir. Hastalık oluşmadan *M. tuberculosis* yayılımının sınırlandırılması başlıca amacı oluşturmaktadır. Aktif TB'lu olguların tanı ve tedavisinde çok uzun süre ve yüksek maliyet gerekmektedir. Belirli *M. tuberculosis* suşunun duyarlı bir popülasyonda yayılırken yakalanmasının çok zor olduğu bilinmektedir. Aktif TB'lu bireylerden soyutlanan izolatların tiplendirilmesi; enfeksiyon kaynağı, yayılım dinamiği ve özelliklerinin ortaya çıkarılmasında önemli rol oynamaktadır.

Mikobakterilerin tiplendirilmesinde; biyokimyasal testler, duyarlılık test sonuçları gibi geleneksel yöntemler kullanılmış, fakat yeterli sonuç elde edilememiştir. *M. tuberculosis* kompleks suşlarının ayırımında faj tiplendirmesi de denenmiş, fakat birkaç tipi tanımlayabilmesi ve teknik olarak çeşitli sorunlar içermesi nedeniyle sınırlı kullanım alanı bulmuştur. Serotiplendirme ise, *M. tuberculosis* kompleks içerisindeki suşların farklılıklarını belirleyememiştir. Bu nedenle, *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesinde moleküler yöntemler kullanılmaktadır<sup>5</sup>.

Tüberkülozun tanı ve tedavisinin başarılı bir şekilde yapılabilmesi, etkili koruma ve kontrol önlemlerinin alınmasına ve tüberkülozun epidemiyolojisinin anlaşılmasına bağlıdır<sup>5</sup>.

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin gelişmesi, klasik epidemiyolojik verilerin değerlendirilmesine büyük katkı sağlamıştır. Türkiye'de tüberkülozun moleküler epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalar daha çok IS6110 RFLP ve pTBN12 tiplendirme yöntemlerine dayalı olarak yapılmıştır<sup>5,6</sup>. Tiplendirme yöntemlerinin; uygulaması kolay, hızlı, yinelenebilir, ekonomik ve klinik örneğe direkt olarak uygulanabilir olması tercih edilmektedir. Günümüzde kullanılan yöntemler bu kriterlerin tümünü karşılayamamaktadır. Ayrıca, yöntemin ayırım gücü ve stabilitesi epidemiyolojik araştırmalarda önem taşımaktadır. Salgınların kontrol altına alınmasında mikroorganizmalar arasındaki evrimsel çeşitliliğin (genetik yakınlığın) gösterilmesi için genetik belirleyicilere gereksinim duyulmaktadır<sup>7,8,9</sup>. *M. tuberculosis*'in moleküler tiplemesi için altın standart IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) metodudur. Standardizasyonu sağlanmış olmasına rağmen uzun zaman alması, kültüre

gereksinim duyulması, yüksek maliyet, RFLP profillerinin laboratuvarlar arası karşılaştırılmasının zorluğu ve düşük kopya sayılı suşların ayırımındaki yetersizlik, bu yöntemin dünya çapındaki epidemiyolojik çalışmalarda kullanımını sınırlamıştır<sup>7,8</sup>.

Son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit* (MIRU)-*Variable Number Tandem Repeats* (VNTR) yöntemi; ayırım gücü ile tekrarlanabilirliği yüksek, uygulaması kolay, çok merkezli çalışmalara uygun ve otomatize edilebilir bir yöntemdir<sup>5,6,7</sup>. Tüberkülozun küresel epidemiyolojik sürveyansı için uygundur. Polimeraz zincir tepkimesi (PZT) bazlı bu yöntemle aynı gün içerisinde sonuç verilebilmektedir. IS6110 RFLP ve spoligotipleme ile kıyaslandığında, MIRU-VNTR tiplene daha fazla ayırıcı profil oluşturmaktadır. Bu nedenle, kabul edilebilir uluslararası standart protokolün adaptasyonunu takiben MIRU-VNTR yöntemi, yakın gelecekte IS6110'u gölgede bırakacaktır<sup>7,8,9,10</sup>.

Ülkemizde ve tüm dünyada çok fazla sayıda insanı enfekte eden ve aktif hastalık oluşturan TB ile savaşmada uluslararası stratejilerin belirlenmesi gereklidir. Tüberkülozun epidemiyolojisinde moleküler tiplendirme yöntemlerinin rutin kullanımı, hastalığın yayılımının ortaya çıkarılmasını ve tüm toplumu ilgilendiren bu halk sağlığı sorununa karşı koruyucu önlemler alınmasını sağlayacaktır. *M. tuberculosis* suşlarının yayılım dinamiği ve özelliklerini ortaya çıkarabilmek amacı ile farklı coğrafik bölgelerde ve laboratuvarlarda çok sayıda suşla yapılan çalışma sonuçları karşılaştırılmalıdır.

Ülkemizdeki MIRU-VNTR profillerinin neler olduğu konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, bölgemizden soyutlanan *M. tuberculosis* izolatlarının tiplendirilmesinde 24 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışma, ülkemizde ilk defa 24 lokus MIRU-VNTR yönteminin kullanıldığı araştırma özelliğindedir. Elde edilen sonuçlar, yüksek virulansa sahip izolatların tespitinde, laboratuvar çapraz kontaminasyonlarının belirlenmesine ve reaktivasyon-reenfeksiyon ayırımı için gerekli moleküler epidemiyolojik çalışmalara ışık tutacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Mikobakterilerde evrim süreci ve filogenetik ilişkilerinin anlaşılması *M.tuberculosis* H37Rv suşunun gen haritasının çıkartılması ve *M. bovis* AF2122/97 suşunun gen haritası ile yapılan karşılaştırma ile netlik kazanmıştır. Ortak bir atasal suşdan köken aldığı bilinen mikobakterilerin, 16S rDNA gen dizi analizlerine ve housekeeping genlerdeki sessiz-sinonim tek nükleotid (SNPs) polimorfizmi sıklığına bakılarak yapılan yaş tayin araştırmalarıyla bu bakterilerinin en az 150 milyon yıldır mevcut oldukları bilinmektedir<sup>1,11</sup>.

MÖ. 17.000’li yıllara ait bizon kemiklerinde yapılan araştırmalarda rastlanan *M. tuberculosis*, buzul çağında da bu bakterin enfeksiyon oluşturma kabiliyetinde olduğunun kanıtıdır. İnsan tüberkülozunun ise Doğu Afrika’da Afrika boynuzundan ilk insanla birlikte evrimleştiği ve dünyaya yayıldığı bilinmektedir<sup>1,11,12</sup>.

İnsan tüberkülozu hakkındaki ilk bilgiler Milattan üç bin yıl önce Nil nehri kenarındaki Dra Abu-El Naga isimli kasabada yaşamış olan ve kanlı balgam çıkararak ölen genç bir kıza aittir. Bunun dışında MÖ. 1000 yılında yaşamış olan rahip Nesperehan’ın mumyasında Pott apsesi görülmüştür<sup>1,11,12,13</sup>.

Günümüzden 2500 yıl önce Bodrum’un karşısındaki Kos adasında yaşamış olan Hippocrates’in kitabında tüberkülozun daha çok 18-35 yaşlarındaki kişilerde görüldüğü yazılıdır<sup>11</sup>. Aceves-Avila ve arkadaşların Meksika’da XVI. Yüzyılda yaşamış Amerikan Yerlileri’ne ait, 443 iskelette yaptıkları araştırmada 19 pot hastalığı rastlanmıştır.

Tüberküloza tarih boyunca bir çok isim verilmiştir. İnsanları eriterek öldürdüğü için “Tüketim hastalığı” anlamındaki “Consumption”, hastaları soldurarak yok ettiği için “Beyaz Ölüm” veya “Beyaz Veba” ve çok insanın yaşamını sonlandırdığı için de “Ölümün Kaptanı (Captain of the Death) denilmiştir. Hipokrat M.Ö. 460’lı yıllarda hırıltılı nefes alıp verme ve öksürükle balgam atma anlamındaki “Phytisis” olarak tanımlamıştır<sup>1,11,12,13</sup>.

Etiyolojik ajan hakkında bir fikir vermese de tüberkülozun bulaşıcı bir hastalık olduğu 1546 yılında Fracassaro G. tarafından “De Morbus Contagiosus” adlı kitabında yazmıştır. Marten B. (1722) bu etkenlerin “muhteşem küçük canlılar” olduğu ve hastaların nefesleri ile yayılarak sağlam kişilerin vücuduna girdikleri tanımlamasını yapmıştır<sup>12,13</sup>.

Osmanlı tarihi ile ilgili verilere bakılacak olursa hekim başlarının kaleme aldığı eserlerde Topkapı ve Dolmabahçe Sarayında tüberkülozlu hastalara rastlamaktayız. III Selimin gözdesi olan Safinaz’ın giderek zayıflaması, öksürük nöbetlerine tutulması ve ateşlenmiş ve Gallopan ftizi teşhisi konmuştur. II. Mahmut’un babası I. Abdülhamit’in ve II. Mahmut’un ise akciğer tüberkülozundan öldüğü bilinmektedir.

Kuzey Amerika’da ve son 1000 yılda Avrupa’da çeşitli tüberküloz epidemilerine rastlanmıştır. 17. ve 18. yüzyıllarda Avrupa nüfusunun % 70’i tüberküloza yakalanmış ve bunların yedide biri ölmüştür. Bu yıllarda Avrupa’da tüberküloz yokluk ve sefaletle bağlanmış, hastalar fakirlik, kötü hayat şartları ve pislikle özdeşleştirilerek toplumdan dışlanmışlardır. Tüberkülozun bulaştırılabilir bir hastalık olduğu, deneysel olarak insandan sığırlara, sığırlardan tavşana hastalığı bulaştırarak ilk sonuçları üreten Antoine V. (1827) hastalığın anlaşılmasında devrim niteliği taşımıştır. Koch R. (1882) tüberküloz basilini patates ve agar karışımı besiyerinde üretmiş ve bu basilleri Paul E.’nin geliştirdiği boyayı modifiye ederek boyayarak gösterip, etkenin bir aside dirençli basil “ARB” olduğunu ispatlamıştır. Seibert F. 1930’lu yıllardan sonra oldtüberkülini saflaştırmış ve elde edilen saflaştırılmış protein türevi (PPD) ile tüberküloz enfeksiyonunun varlığı tespit edilmeye başlanmıştır. Calmette ve Guerin isimli araştırmacılar 1921 yılında Fransa’da ilk tüberküloz aşısını yani Bacillus-Calmette-Guerin (BCG)’i geliştirmişlerdir. BCG aşısı İkinci Dünya Savaşından sonra tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır<sup>11,12,13</sup>. Balkan Savaşları ve 1. Dünya Savaşındaki yoğun yoksulluk koşullarında Anadolu’ya yayılmaya başlayan hastalık, 1940’ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmış ve bu dönemde en sık görülen ölüm nedeni olmuştur<sup>15</sup>.

Tüberküloz tedavisinde klinik etki sağlayan ilk antibiyotik olan streptomisin (STR), 1946’da New Jersey ’de bir toprak mikrobiyoloğu olan Selman Waksman tarafından keşfedilmiştir. STR’nin keşfi ile tüberküloz tedavisinde kemoterapi dönemi başlamıştır. Aynı yıl İsveçli bilim adamı Jorgen Lehman salisilik asidin para-amino



tuzunu sentezleyerek para-amino salisilik asit (PAS)' in tüberküloz tedavisinde kullanımını sağlamış ve bu iki ilacın kullanıma girmesiyle tüberküloz tedavisinde iyi sonuçlar alınmaya başlanmıştır (11). İNH' ın anti-tüberküloz aktivitesinin 1952 yılında gösterilmesi ile İNH, PAS ve STR' den oluşan üçlü tedavi dönemi başlamış ve hastaların % 90-95'i bu üç ilacın 24 ay süreyle devamlı olarak kullanılması ile tedavi edilebilir hale gelmiştir (12). Daha sonra 1954 yılında pirazinamid (PZD), 1962 yılında ethambutol (ETM) ve 1966 yılında rifampisilin (RİF) bulunmuştur. Ancak her keşfedilen ilaçtan 10 ila 20 yıl sonra direnç sorunu ortaya çıkmıştır <sup>18</sup>. İngiliz Tıbbi Araştırma Konseyi (British Medikal Research Council) 1950 yılında PAS ve STR'yi tek tek ve kombine kullanarak ilk karşılaştırmalı, randomize klinik çalışmayı yapmışlar ve kombine tedavinin daha etkili olduğunu ve bu şekilde ilaç direnci gelişiminin engellendiğini açıklamışlardır <sup>1,5,12,18</sup>. 1960'lı yıllarda PAS' ın yerini etambutolün almasıyla iki önemli yarar elde edilmiştir; ETM hem hastalar tarafından PAS' tan daha iyi tolere edilebilmiş hem de tedavi süresini 18 aya indirebilmiştir. Rifampisinin 1970'lerde tedaviye eklenmesi ve bu ilacın kazeöz odaklarda bulunan yarı dormant basillere etkili olduğunun bulunmasıyla tedavi süresi daha da kısalmıştır. Pirazinamidin tedaviye eklenmesiyle kültür negatifliğine ulaşma süresi daha da kısalmış ve 6 ayda % 95'in üzerinde kür oranları elde edilmiştir <sup>1,5,7,12,18</sup>. Antitüberkülozlara gelişen direnç, toplumlarda yoksulluğun artması, kontrolsüz göçler ve AIDS ile tüberküloz yeniden önem kazanan hastalıklar arasına taşımıştır. Tedavi seçeneklerinin sınırlı oluşu ve hasta ilaç uyumsuzluğu, ÇİD ve XDR suşların ortaya çıkışına sebep olarak pandeminin boyutları daha da büyümüştür<sup>17</sup>.

## **2.2. Tüberkülozun Epidemiyolojisi**

Tüberküloz, tedavisi yıllardır bilinen bir hastalık olmasına karşın tüm dünyada hâlâ en yaygın bulaşıcı hastalıklardan birisi olarak önemli bir toplum sağlığı sorunu olmayı sürdürmektedir. Hastalık tüm dünyayı etkilemekle birlikte olguların %85'i Afrika (%30) ve Asya'da (%55) ortaya çıkmaktadır. Hindistan ve Çin'deki tüberküloz (TB) hastaları tüm hastaların %35'ini oluşturmaktadır<sup>18</sup>. 2006 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünyada TB'lu hasta sayısını azaltmak için kanıta dayalı bir yaklaşım olarak Stop TB Stratejisi'ni benimsemiş ve bu amaçla 2006-2015 Küresel Planı'nı bir yol haritası olarak uygulamaya koymuştur. DSÖ Stop TB Stratejisi'nin amaçları;

yüksek kaliteli tanı ve hasta odaklı tedaviye erişimi sağlamak; TB hasta sayısını ve TB'ye bağlı sosyoekonomik yükü azaltmak; fakir ve risk altındaki kişileri TB, TB/HIV ve çok ilaca dirençli tüberkülozdan (ÇİDTB) korumak; yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesini desteklemek, bunların etkili ve zamanında kullanımını sağlamak; TB'dan korunma, TB bakım ve kontrolünde insan haklarının korunması ve iyileştirilmesini sağlamaktır. 2010 yılında elde edilen yeni tanı ve tedavi olanaklarının ışığında bu plan yeniden güncellenmiştir. DSÖ'nün hedeflerinden birisi olan %70 olgu bulma oranı %60-67'ye ulaşmış, %85 tedavi başarısı da yeni yayma pozitif akciğer hastaları için %86-87'ye çıkmıştır<sup>18,19,20</sup>. Küresel planın araştırma geliştirme bileşeninde, tüberküloz ve ÇİD-TB'nin erken tanısı için hızlı bakteriyolojik ve moleküler testlerle birlikte LED floresan mikroskop kullanıma girmiştir. Altı aylık tedavi süresini dört aya indiren yeni ilaç rejimlerinin denendiği faz III çalışmalar umut vericidir. Dünya Sağlık Örgütü son 14 yıldır küresel olarak yıllık tüberküloz verilerini yayınlamakta ve daha güvenli, daha aydınlatıcı bilgilere ulaşmak için de çabalarını sürdürmektedir. TB hastalığı ile mücadelede özellikle sorunlu bölgelerde uluslararası kuruluşlar ve fonların desteği ile son yıllarda önemli girişimler yapılmış ve bunların çıktıkları da alınmaya başlanmıştır. Bu verilerin ışığında günümüzdeki problemin boyutları hakkında daha aydınlatıcı yorumlara olanak sağlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2011 Küresel Raporu TB insidansı, prevalansı ve mortalite hızı ile ilgili olarak daha ayrıntılı bilgiler içermektedir. 17 Afrika ülkesi, Çin ve Hindistan'dan elde edilen veriler daha iyi tahminlerde bulunulmasını sağlamıştır. 90 ülkede ölüm istatistikleri elde edilmiş, Hindistan'dan da önemli mortalite verileri sağlanmıştır. Bu verilere göre TB yeni olgu sayısı 2005 yılında 9 milyonu bularak zirve yapmış, sonrasında düşüşe geçerek 2010 yılında 8.8 milyona gerilemiştir. Bu rakamın yaklaşık %12-14'ünü HIV pozitif hastalar oluşturmaktadır. Mortalite 2003 yılında 1.8 milyon ile tepe yapmış, sonra 2010'da 1.4 milyona düşmüştür<sup>20,21</sup>. Tüberküloz sorununun önemli boyutlarda olduğu Çin'de 1990'dan bu yana insidanda yıllık %3.4 lük düşüş, prevalansta son 2 yılda %20 azalma, mortalitede son 20 yılda %80 düşüş bildirilmiştir. Küresel olarak tahmin edilen ve kayıt edilen hasta sayısı sırayla 1990'da 7.6 milyon ve 3.7 milyon, 2010'da da 8.8 milyon ve 5.8 milyondur. Buna göre olgu bulma oranı %65 olarak bulunmuştur. Tedavi başarısı küresel olarak %87'dir. Avrupa bölgesi %67 tedavi başarısı ile dünya ortalamasının gerisinde kalmıştır. Çok ilaca dirençli tüberküloz ile

ilgili verilere bakıldığında 2010 yılında tahmin edilen hasta sayısı 290 bindir. Bu sayının ancak altıda biri (53 bin) kayıt altına alınıp tedavi almıştır. 2005 yılından beri ülkemizde tüberküloz ile ilgili veriler bireysel olarak ve DSÖ tanımları ile toplanmaktadır. 2006 yılından itibaren ülke çapında DSÖ'nün benimsediği ve önerdiği Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi'nin tüm unsurları ile uygulamasına geçildiği ilan edilmiştir. Bu stratejinin doğrudan gözetim unsuru ülke çapında %97.6 oranında yapıldığı belirtilse de ciddi aksamalar olduğu ve gerçek anlamda doğrudan gözetimli ilaç içirilmediği bilinmektedir<sup>22</sup>. Ülkemizde son dört yıldır veri toplama sisteminde yapılan değişikliklerle daha güvenilir ve ayrıntılı rakamlara ulaşılmıştır.

Türkiye'de 2009 yılı için toplam 17402 hasta kayıtlara girmiştir. Hastaların 10519'u erkek (%60.4), 6883'ü (%39.6) kadındır. Toplam prevalans yüz binde 24 olarak bulunmuştur. Toplam 17402 hastanın 15.943'ü yeni hasta, 1459'u daha önceden tedavi görmüş hastalardır. 2009 yılında akciğer tüberkülozu olan hastaların %88.5'ine bakteriyolojik tetkik yapılmış, mikroskopik pozitiflik oranları %70, kültür yapma oranı %63.6 bulunmuştur. Kültür yapılan olgularda %77.9 pozitiflik belirlenmiştir. İlaç duyarlılık testi yapılan 4320 hastanın %19'unda en az bir ilaç direnci tespit edilmiştir. ÇİD TB oranı %5.1 olarak bulunmuştur<sup>23</sup>. Dünya Sağlık Örgütü'nün tüberküloz kontrol programlarının başarı göstergesi olarak tanımladığı indikatörlerden biri prevalanstır. Türkiye'de 2009 yılı için prevalans yüz binde 25 bulunmuş ve DSÖ'nün 2015 yılı için belirlediği 1990 yılına göre prevalansı yarıya düşürme hedefi tutturulmuş gözükmektedir. Diğer indikatörler olgu bulma oranı ve tedavi başarısına bakıldığında sırayla %81 ve %91 oranları ile hedeflerin üstüne çıkmıştır. Türkiye Verem Savaşı 2010 Raporu'na göre 2002-2009 yılları arasında tüberküloz insidans hızı %27.5, prevalansı %35.9 düşmüştür<sup>24</sup>. Ayrıca yıllar içerisinde yeni olgu sayısı da azalmaktadır. Kanaatimizce bu iyileşmenin en önemli nedeni tedavi başarı oranlarının yükselmesidir. Öte yandan bir numaralı şekilden de görüleceği üzere ulaşılan başarı yeni olmayıp, doksanlı yılların ortalarından itibaren verem savaş dispanserlerinde özellikle nitelikli sağlık insan gücü özverisi ile sürdürülen verem savaşının bir sonucudur. Bu bağlamda ulaşılan başarı, aslında verem savaş dispanserleri özelinde sürdürülen tüberküloz kontrolü stratejisinin doğru olduğunu kanıtlamaktadır. Türkiye Verem Savaşı 2010 Raporu verilerine göre akciğer tüberkülozunda yayma pozitiflik %60'dır. Benzer biçimde kültür pozitiflik oranı %33.5'tir. Bilindiği üzere Doğrudan Gözetimli Tedavi

Stratejisi'nin bileşenlerinden birisi olan yayma incelemesi ve yayma pozitiflik oranının yükseltilmesi gereklidir. Öte yandan kültür pozitiflik oranının oldukça düşük olduğu görülmektedir. Benzer biçimde ilaç duyarlılık testi yapılma oranı da düşüktür. Kanaatimizce ivedilikle Türkiye çapında iyi bir laboratuvar ağının kurulması, kalite standartlarının önemsenmesi ve bu iki aşamadan sonra da tüm olgular için kültür yapılması ve özellikle kimi olgularda hızlı Rifampisin duyarlılığı çalışılması gereklidir<sup>24,25</sup>.

### 2.3. Mikobakteriler ve Sınıflandırılması

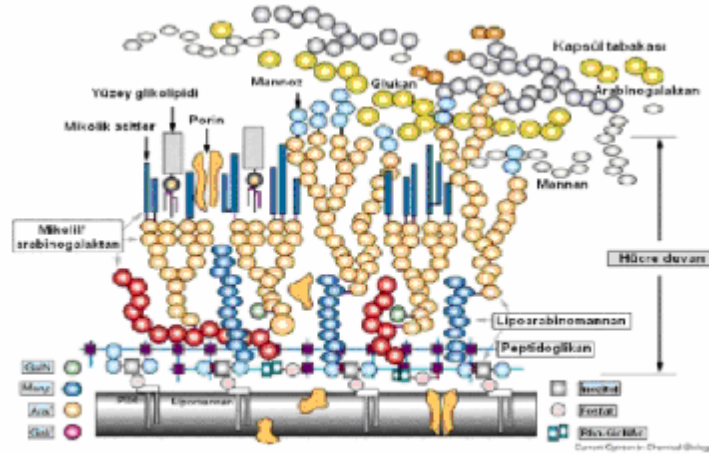
*Mycobacteriaceae* ailesinde sadece *Mycobacterium* cinsi bulunmaktadır. Mikobakteriler; sporsuz, hareketsiz, aside dirençli, bölünme süreleri 12–18 saat olması nedeniyle yavaş üreyen, pleomorfik çomaklardır. Çoğu doğada saprofit olan mikobakterilerin sadece küçük bir oranı yüksek vertebralı hayvanlarda ölümle sonlanabilen hastalıklara neden olan hücre içi patojenlerdir. Mikobakterilerin insanlarda enfeksiyon oluşturan türleri arasında, tüm dünyada önlenebilir ölümlerin en önemli sebepleri arasında yer alan tüberküloz da yer almaktadır. Son derece özelleşmiş hücre duvar yapıları ile korunarak kronik enfeksiyonlara yol açabilmektedirler<sup>17</sup>. Mikobakteri genomunda 20 değişken bölgede meydana gelen insersiyon ve delesyonları dikkate alarak yapılan çalışmalarda filogenetik ilişkileri belirlenen yaklaşık 100 farklı tür olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyolojik özellikleri ve moleküler düzeyde benzerlikleri bulunan yakın ilişkili türler kompleks başlığı altında toplanmaktadır<sup>17,22</sup>. Kültürü yapılabilen mikobakteriler, *M. tuberculosis* kompleks ve tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. *M. tuberculosis* komplekse dahil olanlar genetik olarak çok yakın olduğundan tür yerine alttür tanımlaması kullanılmaktadır<sup>17</sup>.

Kompleks içerisindeki alttürleri; *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* ve *Mycobacterium canettii* ve TB aşısını oluşturan atenüe *M. bovis* BCG oluşturmaktadır. *M. tuberculosis* kompleksin alt türlerinin ayrımı, biyokimyasal testler ve üreme özellikleriyle yapılması zor olduğundan, DNA parmak izi analizi yönteminin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır<sup>7,17,23</sup>.

Tüberküloz dışı mikobakteriler, genetik olarak daha heterojen bir gruptur. Pigment üretimi ve üreme özellikleri açısından atipik mikobakteriler; fotokromojenler,

skotokromojenler, kromojen olmayanlar ve hızlı üreyenler olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Genel olarak atipik mikobakteriler insanlarda sınırlı patojenite gösterirler. *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense* ve *Mycobacterium avium* gibi bazı türler ise özellikle bağışık sistemi baskılanmış hastalarda, TB benzeri tablolara yol açabilirler<sup>17,24</sup>. Genetik olarak heterojen olan *M. avium* kompleks (MAC), genellikle çevresel kaynaklarda bulunur ve TB benzeri hastalığa yol açmazlar. Buna karşın, *M. avium* spp. *avium* alttürü, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde yaygın hastalığa neden olmaktadır<sup>24</sup>. MAC içerisindeki diğer alttür, *M. avium* spp. *paratuberculosis*, genetik olarak belirli ölçüde korunmuşluk göstermektedir. Geviş getirenlerde Johne hastalığına neden olmakta, insanlarda ise Crohn hastalığının etyolojisinde rol oynadığı öne sürülmektedir<sup>25</sup>. DNA dizi analizi yöntemlerinin geliştirilmesi ile son yıllarda *Mycobacterium confluentis*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium interjectum*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium novocastrense*, *Mycobacterium wolinskyi* ve *Mycobacterium goodii* gibi türler de tanımlanmıştır<sup>17,26</sup>. Bu bakterilerin hastalardan izole edilmesinin önemi tartışmalıdır. Bir hastadan aynı mikobakterinin yineleyerek izolasyonu hastalığı düşündürmekte ve antimikobakteriyel tedaviyi gerektirmektedir.

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı alışılmış Gram negatif veya pozitif bakteri hücre duvarlarından oldukça farklı, karmaşık bir yapıdır. Hücre duvar yapısının altında diğer bakterilerde de görülen plazma membranı vardır. Plazma membranının üzerinde bulunan en iç tabaka peptidoglikandır. Bu tabaka kısa peptid zincirleri, çapraz bağlarla sıkıca bağlanan uzun polisakkarit zincirleri içerir ve hücrenin sert yapısını sağlar. Peptidoglikan tabakasına fosfodiester köprüleriyle bağlı olan arabinogalaktan tabakası hücre duvarının %35'ini oluşturur (Şekil 1). Arabinogalaktanlara kovalent olarak bağlanan mikolik asitler, hücre duvar kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Mikolik asitler, trehaloz dimikolata bağlanarak kord faktörü oluştururlar. Bir grup heterojen peptidoglikolipitler veya fenolik glikolipitten oluşan en dış tabaka ise mikozitler olarak 13 adlandırılırlar. Hücre duvarında bulunan ve duvar ağırlığının %60'ını oluşturan lipitlerin çoğu uzun zincirli yağ asitleridir. Bu lipitler tüberkülostearik asit, mikoserik asit ve mikolik asitleri içerirler<sup>27,28</sup>.



Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı (29)

Mikobakterilerin lipid, protein ve polisakaritlerden oluşan antijenleri vardır. Bunlardan OT, Robert Koch tarafından bulunan ve tüberkülin deri testinde kullanılan ısıya dayanıklı bir proteindir. OT'in saflaştırılması ile elde edilen pürifiye protein deriveleri (PPD), DSÖ'nün de önerisiyle tüberkülin deri testinde kullanılmaktadır. Kord faktörü, bakterinin virulansı ile ilgilidir. Kültürden hazırlanan preparatlarda bakterinin demetler halinde bir arada bulunmasından sorumlu olduğu gibi PNL migrasyonunu önleme ve granülom oluşumunu stimüle etme gibi fonksiyonlara da sahiptir. Sulfolipitler (trehaloz 2 sulfat), bakterinin hücre içinde canlı kalmasından ve kord faktörle sinerji oluşturmasından sorumludur. Isı şok proteinlerinin (65Kda, 38Kda, 12Kda), koruyucu immünite gelişmesinde ve komplikasyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir<sup>30</sup>. Mikobakterilerle ilgili çalışmalar; *M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. lepra* türlerinin gen analizlerinin yapılmasından sonra hızlanmış, bakterinin fizyolojik, biyokimyasal, antijenik ve genetik özellikleri hakkındaki bilgiler artmış, bu bilgilerin ışığında yeni profilaksi ve tedavi 14 çalışmaları başlamıştır. *M. tuberculosis* H37Rv suşunun gen büyüklüğü 4.411.529 baz çifti (bç) olup yaklaşık 3.986 proteini kodlamaktadır. Buna karşılık *M. tuberculosis* CDC1551 suşu 4.403.836 bç olarak tespit edilmiş ve yaklaşık olarak 4.187 proteini kodladığı bildirilmiştir. *M. lepra* genomu ise 3.300.000 bç kadardır. Bu suşlarda tanımlanabildiği kadarı ile genomun büyük kısmının (%59) replikasyonla ilgili olduğu, kalan bölgenin %30'unun lipid ve poliketit sentetaz ile ilgili genler, %10'ununda PE (prolin glutamat) ve PPE (prolin-prolinglutamat) olarak

tanımlanan iki akraba gen ailesine ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca “noncoding” diziler (13E12 ailesi), insertion dizileri (IS) ve mikobakterilere özgün “Mikobakteri tekrarlayan üniteleri” (MIRU) kodlayan gen bölgeleri de tespit edilmiştir. Mikobakterilerde PE ve PPE proteinlerini kodlayan gen dizileri dışında kalan bölgelerde Guanin (G) + Sitozin (C) oranının da alışımlı bakterilerden daha yüksek oluşu (%80), bunların farklı bir gen ailesi oluşturduğunu göstermektedir<sup>26,28,31,32</sup>.

Mikobakterilerde lipit metabolizması ile ilgili genlerin çokluğu bu bakterilerin metabolizmalarında lipitleri kullandıklarını göstermektedir. *M. tuberculosis* genomunda da *E. coli*'deki *FadD* geni ve *FadE* geni ile homolog 36 gen bölgesi bulunmaktadır. *M. tuberculosis* genomundaki diğer önemli gen toplulukları olan PE ve PPE genleri hücre duvar lipitlerinin sentezinde önemli rol oynayan ve bağışık sistemi baskılayan suda çözülmeyen çok sayıda protein kodlarlar. Bu gen bölgeleri adlarını kodladıkları proteinleri amino N uçlarındaki motiflerden alırlar. Konservatif özelliğe sahip bu motiflerden PE yaklaşık olarak 110, PPE ise yaklaşık olarak 180 aminoasit büyüklüğünde yapılarıdır. Bu proteinlerin C terminal uzantıları ise 100–1400 aminoasit arasında değişmektedir. Protein analiz çalışmaları ile mikobakterilerde 38 PE proteini, 61 PE-PGRS proteini ve 68 PPE proteini tespit edilmiştir. PE ailesi proteinleri arasında filogenetik analiz yöntemi ile çok sayıda alt grup tespit edilmiştir. Tüm PE'nin %50'sinden fazlasını oluşturan, Gly-Gly-X tekrarlayan dizisine sahip olan glisin zengin polymorphic glycin repetitive sequence (PGRS) grubun en büyüğüdür. PPE ailesinde yer alan proteinler de 3 alt grup içerisinde toplanmıştır. Bunların ilki; NxGxGNxG tekrarlayan (major polymorphic tandem repeated–MPTR) dizileri taşıyan gruptur. İkinci alt grupta ise GxxSVPxxW tekrarlayan bölgelere sahip proteinler yer alırken 3. gruptaki proteinlerin benzer tekrarlayan bölgeleri yoktur. PE ve PPE genleri tarafından kodlanan proteinler hücre duvarı sentezinde rol oynayan antijenik özelliğe sahip proteinlerdir. Bu proteinlerin yapısındaki değişiklikler konağın bağışık yanıtından korunmada etkili olmaktadır<sup>7,23,26,32</sup>.

Mikobakteriler hücre duvarı komplekslerinin düşük permabilite ve hidrofobisite özellikleri nedeniyle hidrofilik antibiyotikler, metal iyonları, dezenfektanlar gibi kimyasal toksik ajanlara ve oksijen radikalleri gibi hücrel toksinlere intrinsik dirence sahiptirler. Bu özellikleriyle hücre içi ve hücre dışında korunan mikobakteriler, hücre duvarlarındaki bazı yapılarla konağın bağışık yanıtını da etkileyerek, asemptomatik

taşıyıcılıktan tedaviye cevap vermeyen ve yüksek mortaliteyle seyreden kronik granümatöz enfeksiyonlara kadar değişen klinik tablolara yol açarlar<sup>28,31</sup>.

Tüberküloz; ateş, öksürük, kanlı balgam, kilo kaybı, halsizlik gibi semptomlar vermektedir. İlerleyici akciğer hasarı oluşur ve bakterilerin akciğer dışına çıkması ile kemikler, eklemler, karaciğer, dalak, gastrointestinal sistem ve beyin tutulumu olabilir. Hastalığın sistemik formu olan milier TB ise sıklıkla ölümcül seyretmektedir. Öksürme ile ortama salınan çok küçük damlacıklar, hem üst solunum yolu savunma mekanizmalarını aşarlar, hem de büyük partiküllere oranla havada daha fazla asılı kalırlar. İnsandan insana aerosollerle bulaşan TB hastalığı genellikle sinsi seyretmekte, hastanın sağlığı yıllar içerisinde bozulmaktadır. AIDS'li hastalarda ise TB çok daha hızlı ilerlemekte, aylar içerisinde ilerleyerek %80'lere varan ölüme neden olmaktadır<sup>18,30</sup>. Son yıllarda özellikle, gelişmiş toplumlarda doğumsal veya kazanılmış bağışıklık yetmezlik artışına bağlı olarak, *M. tuberculosis* izolatlarında çoklu ilaç direncinin artması ve bu suşlarla oluşan enfeksiyonlardan %70'inin 4–6 hafta gibi daha kısa bir sürede ölümle sonlanması mikobakterilerle ilgili çalışmaların yeniden hız kazanmasına neden olmuştur. Mikobakterilerde 1960'lı yıllarda iki ilaca karşı %1–2 oranında olan direnç, 1991 yılında dört ilaca karşı %13 gibi yüksek oranlara ulaşmıştır. Bu nedenle çalışmaların odağını daha etkili, özellikle bakterisidal yeni antibiyotikler ve koruyucu bağışık yanıtı uyatabilecek yeni aşılar yaratmak oluşturmaktadır. Bu amaçlara ulaşabilmek için de mikobakteri hücre duvar yapısı, fizyolojik ve kimyasal özellikleri ve biyosentez mekanizmalarının çok iyi incelenmesi gerekmektedir<sup>28,31</sup>.

#### **2.4 Mikobakterilerin Tanısında ve Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler**

Klinik, radyolojik ve/veya patolojik bulgularla bir hastada tüberkülozdan kuşku kullanılabilir. Ancak hastalığın kesin tanısı sadece klinik örneklerde tüberküloz basilinin varlığının kanıtlanması ile mümkündür. TB tanı yöntemlerinin amacı, klinik örneklerde mikobakterilerin varlığını göstermek ve hastalık etkeni olan türü izole etmektir. Tanının tam ve doğru olarak yapılabilmesi uygun örneğin, uygun yöntemle alınmasına, uygun koşullarda laboratuvara gönderilmesine, uygun yöntemle işlemlenmesine bağlıdır. Tüberküloz laboratuvarına gönderilen solunum yolu örnekleri arasında balgam, indüklenmiş balgam, açlık mide suyu, bronkoalveolar lavaj (BAL),



bronşiyal fırçalama örnekleri bulunur. Solunum yolu dışında ise idrar, doku biyopsi, beyin omurilik sıvısı (BOS), periton sıvısı, plevra sıvı ve perikardiyal sıvı gibi örnekler sayılabilir<sup>33</sup>.

#### **2.4.1. Örneklerin İşlenmesi**

Mikobakterilerle birlikte kontaminasyona neden olabilen bakteri, mantar ve bu mikroorganizmaların etrafını saran lökosit, eritrosit ve doku gibi organik kalıntılar besiyerlerinde üremeyi baskırlar. Balgam gibi normalde steril olmadığı düşünölen örneklere bu organik kalıntıları sindirmek ve kontaminasyona neden olan organizmaları elimine etmek için dekontaminasyon ve homojenizasyon, ardından bakteri yoğunluğunu artırmak amacıyla konsantrasyon işlemleri uygulanır. Laboratuvarında tüm işlemler biyogüvenlik kabinlerinde ve belirli standartlara uyularak yapılmalıdır<sup>33</sup>.

#### **2.4.2. Mikroskopik inceleme**

Mikroskopi ile hasta örneğindeki tüberküloz basillerinin tespit edilmesi, tüberküloz hastalığının tanısını koymak için en hızlı, en ucuz ve pratik bir yöntemdir. Tüberküloz basilinin ikiye bölünme süresi ortalama 18 saat olduğundan, kültür ile üretilmesi uzun zaman almaktadır. Bu nedenle de tüberküloz için mikroskopik tanı günümüze kadar önemini korumuştur. Ancak mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görölebilmesi için örneğin mililitresinde en az 5000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir, bu durum yöntemin duyarlılığını azaltmaktadır<sup>(33,34)</sup>. Aside dirençlilik; bakterinin hücre duvarının yapısına bağlıdır ve geliştirilmiş pek çok boyama yöntemiyle gösterebilir. En sık kullanılan boyalar fenol solüsyonu içeren boyalardır. Lipitten zengin hücre duvarına bu boyalar daha iyi penetre olmaktadır ve renk giderici asit-alkol ile işlemlendiğinde hücre duvarından ilk boyanın uzaklaştırılması çok zordur. Sertleşen hücre duvarı boyayı bırakmaz. Ek olarak zıt renkli bir boya ile tekrar boyama işlemleri aside dirençli bakterilerin (ARB) daha rahat görünmesi içinde kontrast sağlayacaktır<sup>(33)</sup>. ARB boyama yönteminde dekontamine ve konsantre edilmiş örneklerden hazırlanmış preparatlar tespit edildikten sonra boyama işlemleri uygulanır<sup>33</sup>.

A. Karbol fuksin boyama; ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilir.

a. Erlich Ziehl-Neelsen (EZN)

b. Kinyoun

B. Florokrom boyama; floresan mikroskobu kullanılarak değerlendirilir.

a. Auramin-Rodamin

b. Auromin O

Erlich-Ziehl Neelsen (EZN), en yaygın kullanılan aside dirençli boyama yöntemidir. EZN ile boyanmış bir preparatta en az 300 mikroskop sahası tarandıktan sonra negatif olduğuna karar verilmelidir. 300 mikroskop alanında tespit edilen 1-2 basil şüpheli olarak değerlendirilirken 100 alanda 1-9 basil görülmesi (+), 10 alanda 1-9 basil görülmesi (++), her alanda 1-9 basil görülmesi (+++) olarak değerlendirilirken, her alanda 10'dan fazla basilin görülmesi (+++++) olarak yorumlanmalıdır. Florokrom boyama yöntemiyle, bol miktarda hasta örneği incelenebilmekte, bu nedenle az sayıda bakterinin bulunan örnekler bile tespit edilmekte, değerlendirmeler daha hızlı ve kolay olarak yapılabilmektedir. Florokrom yöntemle pozitif tespit edilen örneklerin EZN boyama yöntemiyle doğrulanması önerilmektedir. Direkt preparat hazırlama aşaması, aerosol oluşturan bir işlem olması nedeniyle çalışan personel ve çevreyi korumak için güvenlik kabini içinde yapılmalıdır <sup>(33,34)</sup>.

### **2.4.3. Kültür yöntemleri**

Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen tür düzeyinde tanımlama için izolatların elde edilebilmelerini, bakterilerin canlılıklarının doğrudan gösterilmelerini, ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastaların doğru tedavi edilebilmelerini, çoğaltılan izolatların daha sonraki araştırmalar için saklanmalarını sağlaması açısından, TB'un tanısında altın standart olmaya devam etmektedir. Mikobakteri kültürü için sıvı ve katı besiyerleri kullanılabilir. Katı besiyerleri yumurta bazlı besiyerleri ve agar bazlı besiyerleri olarak iki grupta incelenebilir. Bu besiyerlerinin tümü, antibiyotik eklenerek seçici hale getirilebilir.

En hızlı üreme sıvı besiyerlerinde gözlenmekte, ancak koloni morfolojisini inceleme şansı olmamaktadır. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) mikobakterilerin birincil izolasyonunda klasik katı besiyerleri yanı sıra sıvı

besiyerlerinin de birlikte kullanılmasını önermektedir. Eğer iki katı besiyeri kullanılacaksa besiyerlerinden birinin seçici olması önerilmektedir <sup>(30,33)</sup>.

#### **2.4.4. Duyarlılık Testleri**

*M. tuberculosis*'in duyarlılık testlerinde katı ve sıvı besiyerleri kullanılmaktadır <sup>(35,36)</sup>. Başlıca, katı besiyerlerinden; LJ, Middlebrook 7H10 ve 11, sıvı besiyerlerinden ise; Middlebrook 7H9 içeren besiyerleri kullanılmaktadır <sup>(35,37)</sup>. Duyarlılık testlerinde, agar proporsiyon yanısıra BACTEC 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) yöntemi de CLSI tarafından önerilmekte ve altın standart olarak kabul edilmektedir <sup>(35)</sup>.

Diğer geleneksel yöntemlerden; mutlak konsantrasyon, direnç oran ve disk elüsyon yöntemleri sayılabilir. BACTEC 460 TB dışında hızlı kültür sistemlerinden Myco-ESP (Extra Sensing Power) II (Trek Diagnostics, Inc., Westlake, Ohio), MB/Bact T (Organon Teknika, Durham, NC), BACTEC 9000, BACTEC MGIT (Mycobacteria growth indicator tube) 960, TK (Salubris, İstanbul) sistemlerinin de duyarlılık testleri geliştirilmiştir <sup>(35,38)</sup>. Ayrıca; kolorimetrik yöntemler, modifiye agar-dilüsyon yöntemleri, E-test yöntemi, mikobakteriyofaj yöntemi, lusiferaz taşıyıcı faj yöntemi, biyoluminesans (hücre ATP ölçümü), flow sitometri yeni duyarlılık yöntemleri arasında sayılabilir <sup>(36,38)</sup>. Bu yöntemler dışında polimeraz zincir tepkimesi (PZT), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *single-strand conformation polymorphism* (SSCP), heterodubleks analizi, *dideoksifingerprinting* (ddF), otomatize DNA dizi analizi, katı faz hibridizasyon gibi moleküler yöntemler de direnci belirleyen mutasyonların tespit edilmesinde kullanılmaktadır <sup>(38,39)</sup>.

#### **2.4.5. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)**

TB'un laboratuvar tanısında ARB mikroskobisinin duyarlılığının düşük olması, kültür de üremenin uzun zaman alması, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren yeni yöntem arayışlarına neden olmuştur. Moleküler yöntemler, özellikle mikroskopi ile görülmesi, kültürde üretilmesi uzun zaman alan, zor veya olanaksız mikroorganizmaların tespit edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Moleküler yöntemler oldukça hızlı olmaları ve tanımlama aralıklarının genişliği nedeniyle mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında da yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu moleküler yöntemlerin tüberküloz tanısında

kullanımının yaygınlaşması tüberküloz tanısına hız kazandırmıştır. Moleküler testler doğrudan klinik örneklerden *M.tuberculosis*'in tespit edilmesi yanında, kültürde üretilen mikobakteri türlerinin tesbiti veya tiplendirilmesi, antimikobakteriyal ilaçlara karşı dirençli olup olmadıklarının araştırılması ve epidemiyolojik araştırmalarda da kullanılmaktadır<sup>(40,41)</sup>.

Klinik örnekten TB tanısına yönelik moleküler testler genel olarak nükleik asit amplifikasyonu (NAA) temeline dayanmaktadır. Bu testlerde diğer enfeksiyon etkenlerinde olduğu gibi *M. tuberculosis*'in özgül nükleik asit dizisinin, tespit edilebilecek düzeye gelinceye kadar çoğaltılması amaçlanmaktadır. Bu sistemler için primer çoğaltma hedefleri *M.tuberculosis*'e özgül IS6110 insersiyon dizisi ve 16S rRNA geni ile 23S rRNA'dır<sup>(40,41,42)</sup>. Klinik örnekten TB tanısına yönelik moleküler yöntemler genellikle üç ana basamaktan oluşur: İlk basamak klinik örnekten mikroorganizmanın nükleik asitlerinin elde edildiği ekstraksiyon basamağıdır. Fenol-kloroform yöntemi, distile suda kaynatma, deterjanlar ile proteinaz K, değişik kimyasalların kullanımı (Chelox-100, Guanidin vb.) ve sonikasyon gibi değişik ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Ayrıca ticari olarak kullanılan DNA/RNA ekstraksiyon kitleri de mevcuttur. İkinci basamakta hedef nükleik asit bölgesinin (DNA veya RNA) tespit edilebilir düzeye gelinceye kadar çoğaltılması değişik tekniklerle gerçekleştirilebilir. Bu tekniklerden en sık kullanılanlar arasında PZT, TMA (Transcription mediated amplification), SDA (Strand displacement amplification) sayılabilir. Üçüncü basamakta çoğaltılmış olan hedef bölgenin (amplikon) özgül problarla tespit edilmesinde değişik tekniklerle gerçekleştirilebilmektedir [hibridizasyon, ters hibridizasyon (*revers hybridization*), DNAELISA, gerçek zamanlı belirleme (*real-time detection*), *hybridization protection assay* (HPA) gibi]<sup>17,42</sup>. Klinik örneklerden *M. tuberculosis*'in belirlenmesinde in-house yöntemler kullanılabilmesine karşın, son yıllarda çok sayıda ticari testler piyasaya sürülmüş ve bunlardan ikisi tanı amaçlı kullanım için ABD'de FDA (Food and Drug Administration) onayı almıştır. Günümüzde otomatize veya yarı otomatize ve standardize ticari testler giderek artan oranda rutin tanıda kullanılmaktadır<sup>(17,33,40)</sup>.

#### 2.4.5.1. In-house PZT

Geleneksel in-house PZT, nükleik asitlerin istenilen kısımlarının, bölgeye özel, sentetik oligonükleotid primerleri kullanılarak, in vitro ortamda kopyalanmasını esas alır. Hedef olarak rRNA veya genomik DNA'nın ayırıcı özellik taşıyan farklı bölgeleri kullanılabilir. Kopyalama işlemi kısa sürmesi büyük bir avantajdır. Yöntemin bir diğer avantajı, az miktarlarda hedef molekül olduğu hallerde dahi sonuca gidebilmektir. PZT için, mililitrede 10 basil bulunması tanı için yeterli olmaktadır. Burada en önemli faktör, DNA kontaminasyonudur. DNA dayanıklı bir moleküldür. Laboratuvar uygulamaları sırasında aerosol ile reaksiyona girerek, yalancı pozitiflik yaratabilir. Bununla birlikte, çalışılan materyalin türüne göre, PZT'nin inhibe olması söz konusu olabilir ki bu da yalancı negatif sonuçların ortaya çıkmasına neden olur. Yöntemin güvenilirliğinin sağlanması için mutlaka negatif ve pozitif kontrollerle çalışılmalı, sonuçlar klinik bulgular ve diğer laboratuvar yöntemleri ile bir arada değerlendirilmelidir <sup>(17,40)</sup>. DNA'nın çoğaltılabilmesi için PZT tepkime karışımında olması gerekenler; DNA ekstraktı, primerler, dNTP karışımı, DNA polimeraz, tamponlar ve MgCl<sub>2</sub>'dir. Tüm karışım "thermal cycler" aletine yerleştirilir ve özgül programı uygulanır. Çoğaltılan PZT ürünleri değişik yöntemlerle belirlenir. En yaygın kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir. Agaroz jel elektroforezinde görülebilmesi için floresan bir boyayla boyanır. Oluşan DNA bantları UV ışığı altında görünür hale gelir (43). In-house (home-Brew) PZT olarak tanımlanan teknikte standardizasyon eksikliği, laboratuvarlar arası değişen duyarlılık ve özgüllüklere neden olmaktadır. Bir çalışmada yedi farklı laboratuvarda aynı 200 örnek 20 çalışılmış ve %3–77 arasında değişen yanlış pozitif sonuçlar elde edilmiştir<sup>44</sup>. In-house PZT kullanılarak yapılmış 84 çalışmanın bulgularının değerlendirildiği bir meta analiz sonucunda duyarlılık ve özgüllüğün sırasıyla %9–100 ve %6–100 arasında değiştiği görülmüştür <sup>(45)</sup>. Bu nedenle günümüzde klinik örneklerde *M. tuberculosis* belirlenmesinde daha standardize moleküler testler tercih edilmektedir.

#### 2.5. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

Tiplendirme yöntemlerinde bazı özellikler aranmaktadır: . Sonuçların yinelenebilirliği: Belirli bir suşla yinelenen yöntemin, aynı sonucu verebilme yeteneği

olarak tanımlanabilir. Epidemiyolojik olarak birbiriyle ilişkili hastalardan elde edilen bir suşun aynı veya benzer tiplendirme sonucunu vermesidir.

- Ayrım gücü: Tipleme yönteminin bir türün farklı suşları arasında etkin ayrım yapabilme özelliğidir.
- Tekniğin kullanım kolaylığı, fiyatı, sonuç verme süresi ve sonuçlarının kolay yorumlanabilir olması: Tipleme yöntemi basit ve ekonomik olmalıdır. Yöntemin kolay uygulanabilirliği ile klinik laboratuvarlarda yaygın kullanımı arasında ilişki vardır. Teknik olarak karmaşık olan yöntemler, rutin uygulamalardan çok referans laboratuvarlarda kullanılmaktadırlar.

Bu kriterlerin tamamını karşılayacak tek bir yöntem olmadığı için testlerin birlikte kullanımı gerekli bir kural gibidir. Tek merkezi ilgilendiren kısa süreli bir salgından izole edilen suşların ayrımı yapılacak ise, bir tipleme yöntemi yeterli olmaktadır. Ancak, ülke genelinde yapılacak olan kapsamlı epidemiyolojik çalışmalarda birkaç tipleme yönteminin birlikte kullanılması gerekmektedir <sup>(46)</sup>. Genel olarak tiplendirme yöntemleri fenotipik ve genotipik olmak üzere iki grupta incelenir.

### **2.5.1. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Fenotipik Yöntemler**

Bugün bilinen bakterilerin çoğu 19–20. yüzyıllar arasında tanımlanmış, fenotipik özellikleri belirlenmiştir. Bir bakteride özgül olarak bulunan fenotipik özellik, suşun yayılımı hakkında bilgi verebilmektedir. Ortak fenotipik özelliklere sahip suşlar söz konusu olduğunda ek olarak; biyotiplendirme (biyokimyasal reaksiyonlar, çevre şartlarına tolerans), antibiyotik duyarlılıkları, başta ağır metaller olmak üzere çeşitli kimyasal maddelere duyarlılıkların belirlenmesi, faj ve bakteriyosin tiplendirmesi, serotiplendirme, protein elektroforezleri (tam hücre proteini, immunoblotting, multilokus enzim elektroforezi, zimotiplendirme) gibi yöntemler kullanılmaktadır. *M. tuberculosis* suşlarının ayırımında kullanılan faj tiplendirmesi sadece birkaç farklı tipi tanımlayabilmesi ve teknik olarak çeşitli sorunlar içermesi nedeniyle sınırlı kalmıştır. Serotiplendirme ise *M. tuberculosis* kompleksi içerisindeki suşların farklılıklarını tespit edememektedir <sup>(47)</sup>. Mikroorganizma üzerindeki çevresel seçici baskılar, değişken antijenik yapı, antibiyotik tedavilerinin direnç gelişimine etkileri, fenotipik özelliklerin

farklı genlerde kodlanabilmesi, ticari olarak bulunmayan bazı ayraçların gereksinimi, bir tür içerisindeki suşun ayırtedici özelliklerinin yetersiz olması, fenotipik yöntemlerin duyarlılığını azaltmaktadır. Bu nedenle, *M. tuberculosis* suşlarının basit ve hızlı tiplendirilmesi için genotipik yöntemler denenmektedir.

### **2.5.2. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Genotipik Yöntemler**

*M. tuberculosis* genomunun bütün dizilimi çıkarılmıştır. Genom yaklaşık 4,4 mega baz çiftinden oluşmakta ve %62–70 gibi oldukça yüksek oranda G + C içermektedir. Mikobakterilerin doğru şekilde tiplendirilmeleri için kullanılacak en ideal yöntem tüm genomun dizi analizini yapmaktır. Ancak genomun büyüklüğü dikkate alındığında bunun zaman alıcı ve maliyetinin yüksek olması kullanımını sınırlamıştır<sup>(9)</sup>. Bu nedenle mikobakteri DNA'sının veya özgül bir bölgenin restriksiyon enzimi (RE) ile kesimi, genom üzerinde bulunan tekrarlayan bölgeleri ya da bunların arasındaki boşlukların polimorfizmini hedefleyen yöntemler geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır<sup>(48)</sup>.

#### **2.5.2.1. Kromozomal DNA Analizi**

[Southern blotting, RFLP yöntemleri ve problu hibridizasyon (DNA fingerprinting)]: Southern blotting yöntemiyle birçok mikroorganizmanın genomik dizisi incelenmektedir. Kromozomal DNA, RE ile kesilir ve parçalar agaroz jel içerisinde elektroforez ile yürütülür. Membrana bağlı nükleik asit daha sonra bir veya daha çok işaretli ve incelenen genle homolog olan prob ile hibridize edilir. Bu yöntem; incelenen özel genetik bölge içerisinde çeşitli RE'lerinin tanıdığı yerlerin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu bölgeler suşlar arasında değişkenlik göstermekte ve farklı büyüklükte bantlar oluşmaktadır. Tanımlanmış genetik bölgelerden RE ile kesilen parçaların polimorfik yapıda olması nedeniyle, yöntem RFLP adı verilmiştir. RFLP analizinde sadece prolarla hibridize olan DNA parçaları görünür hale geldiği için, sonuçların analizi de büyük ölçüde kolaylaşmıştır<sup>(47)</sup>.

#### **2.5.2.2. PZT bazlı tiplendirme yöntemleri**

PZT, 50–2000 baz çiftli DNA veya RNA'nın yarı otomatik sistem içerisinde birkaç saatte bir milyondan daha fazla çoğaltılmasını sağlayan ardışık üç basit

tepkimenin (denatürasyon, bağlanma, uzama) bir döngü halinde yinelenmesidir. Duyarlılığı, özgüllüğü yüksek ve hızlı bir yöntem olması, mikroorganizmaları doğrudan tiplendirilebilmesi yararlı özellikleridir. Buna karşın, kontaminan DNA'nın çoğaltılması ya da epidemi ile ilgisi bulunmayan mikroorganizmaların benzer nükleik asit sıralarının tanımlanmasına bağlı yalancı pozitif sonuç vermesi, primerlerin sadece hedeflenen nükleik asit dizisini tanımlaması ve DNA kaybı nedeniyle yalancı negatif sonuçlar başlıca olumsuz özellikleridir. Geleneksel PZT'nin sahip olduğu dezavantajları ortadan kaldırmak için nükleik asit tabanlı yeni moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiştir. (49,50).

#### **2.5.2.2.1. PZT bazlı bölgeye özgül RFLP**

Bu yöntemde PZT ile özgül gen bölgesi çoğaltılır ve RFLP analizi ile incelenir. İncelenen suşlar arasındaki farklılıklar belirlenir veya antimikrobiyal direnç ortaya çıkarılır.

#### **2.5.2.2.2. Rasgele çoğaltılan polimorfik DNA**

[Random amplified polymorphic DNA (RAPD) = *Arbitrarily Primed* PZT (AP-PZT)]: Düşük ısılarda kromozomal DNA dizilerine bağlanan 9–10 bazdan oluşan rasgele primerlerin kullanıldığı bir yöntemdir. Bu rasgele primer bölgeleri, yerleşim ve sayıları yönünden bir bakteri türünün değişik suşlarında farklılık göstermektedir. Sonuçta agaroz jelde elektroforez ile her suş için karakteristik bantlar ortaya çıkmaktadır.

#### **2.5.2.3. DNA dizi analizi**

Özel bir bölgenin tüm dizgisi çıkarılır. DNA dizi analizinde, hedeflenen gen bölgesi için kullanılacak primerler belirlenerek hedef nükleik asit PZT ile çoğaltılır. Elde edilen PZT ürünü saflaştırıldıktan sonra poliakrilamid jel üzerinde yürütülerek gen dizisi içerisindeki bazlar tanımlanır. Otomatize sekanslama cihazları ve bilgisayarlı sistemlerle PZT ürününün dizgisi belirlenir. Adenin (A), C, G, timin (T) bazları için dört farklı floresan boya kullanılarak farklı dalga boylarında ışımaların büyüklükleri ve tipleri bilgisayar yardımıyla bir elektroferogram üzerinde gösterilmektedir. DNA dizi analizleri hem mutasyonel değişimlerin belirlenmesi hem de suşların genetik



özelliklerinin ortaya çıkarılmasında çok etkin bir yöntemdir. Ancak özel ve pahalı ekipman gerektirmesi bu yöntemin rutinde kullanılmasını zorlaştırmaktadır<sup>24,52</sup>.

## **2.6. *Mycobacterium tuberculosis*'in Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler**

Moleküler tekniklerin gelişmesiyle, *M. tuberculosis*'in filogenetik özellikleri ve yayılma dinamikleri daha iyi anlaşılabilir hale gelmiştir. Moleküler tiplene ile tüberkülozun rekürrensi, sekonder enfeksiyonun reenfeksiyon veya reaktivasyon olup olmadığı ve bir hastada aynı anda iki veya daha fazla suş ile enfeksiyonun varlığı ortaya konulabilmektedir. Böylece tüberküloz kontrol ve tedavi protokollerinin etkinliği araştırılabilmektedir. Salgınların araştırılmasında ve laboratuvar içi çapraz bulaşın tanımlanmasında büyük yararlar elde edilmektedir. Bu yöntemlerle belirli bir coğrafik alan içindeki bulaşın analizi yapılabilmektedir. Moleküler tiplene yöntemleriyle çoklu ilaç direnci olan suşların belirlenmesi, kaynak ve yayılma yolları gösterilebilmektedir. *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesi, bir toplum veya aile içindeki enfeksiyonun kaynağı, yayılması ve direnç kazanmış olan suşların erken tespiti gibi önemli epidemiyolojik soruların yanıtını verebilir. Moleküler yöntemler, tüberkülozun yayılmasını etkileyen faktörlerin daha iyi anlaşılmasında ilave araçlar olarak kullanılabilir. Risk faktörlerinin belirlenmesi ve bölgesel kontrol programlarının değerlendirilmesi, daha rasyonel ve etkili kontrol önlemlerinin alınabilmesine olanak sağlayabilir. Eğer bir toplumdaki tüberküloz vakalarının önemli bir kısmı yeni oluşmuş bir bulaş sonucunda meydana gelmiş ise, bu durum o toplumda tüberkülozun önlenmesi için alınmış olan korunma tedbirlerinin yetersizliğini göstermektedir. Bir tiplene yönteminden beklenen, suşa özel genetik profili ortaya koyabilmesidir. Bu profiller parmak izi “fingerprints” olarak adlandırılır. İki veya daha fazla suş aynı veya çok benzer profil oluşturuyor ise bunlar aynı küme (cluster) içinde olarak adlandırılır. Farklı hastalardan izole edilen fakat aynı genetik profili gösteren izolatlar, büyük olasılıkla epidemiyolojik olarak ilişkilidir. Bu durum genellikle hastalar arasındaki yeni bulaşmayı yansıtmaktadır<sup>54,55,56</sup>.

Moleküler yöntemlerde, genellikle genom üzerinde bulunan yineleyen elemanlar kullanılmıştır. Bu elemanları şu şekilde sıralayabiliriz:

1. İnsersiyon sekansları (*Insertion sequence - IS*): IS986, IS987, IS1081, IS6110
2. Major Polimorfik Düzenli Yineleyen Elemanlar (*Major Polymorphic Tandem Repeats - MPTR*)
3. Polimorfik GC-zengin Sekanslar (*Polymorphic GC-rich Sequences - PGRS*)
4. Değişken Sayılı Düzenli Yineleyen Elemanlar (*Variable Number Tandem Repeats - VNTR*)
5. Direkt Yineleyen Elemanlar (*Direct Repeats - DR*) Yineleyen DNA sekanslarının *M. tuberculosis* epidemiyolojisinde kullanılması 1980'li yılların sonlarında yapılan çalışmalarla başlamıştır.

### **2.6.1. RFLP**

RE'ler çiftsarmal DNA'yı çok özgül olarak belirli bölgelerden keserek parçalara ayırmaktadır. DNA, bir veya daha fazla RE ile kesildikten sonra, agaroz jel elektroforezinde bantların ayrışması ve böylece DNA parçalarının büyüklüğü ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe RFLP adı verilir. Yöntem genel olarak DNA'nın izolasyonu, RE ile kesim, elektroforez, jelin görüntülenmesi ve yorumlanması aşamalarından oluşur. Bu yöntemde kullanılacak enzimlerin seçiminde genomik DNA'yı en fazla 20 noktadan kesecek RE seçilmelidir. DNA'nın küçük parçalara ayrılmasıyla oluşan çok sayıda bant, sonuçların yorumlanmasını güçleştirmektedir. Bu yöntem temel alınarak çok sayıda yeni metot geliştirilmiştir<sup>57,58</sup>.

#### **2.6.1.1. Hibridizasyon bazlı RFLP**

DNA polimorfizmi, kesime uğratılmış nükleik asitlerin, genomik DNA veya özgül parçalarla hibridizasyonu ile gösterilebilir. Prob olarak DNA'nın tamamı kullanıldığında zeminde problem olmakta ve sonuçların yorumlanması güçleşmektedir. Bu nedenle genellikle *M. tuberculosis*'den klonlanmış tekrarlayan DNA dizileri kullanılmaktadır. Tekrarlayan elementlerin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilmesi için farklı suşlar arasında polimorfizm bulunmalıdır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı IS6110-RFLP yöntemidir.

### 2.6.1.1.1. IS6110-RFLP

*M. tuberculosis*'de bulunan tekrarlayan bölgelerden birisini IS (İnsersiyon sekansları - *Insertion sequences*) oluşturur. Bu güne kadar birçok yerleşim elementi tanımlanmıştır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı IS6110'dur. 1324 baz çifti uzunluğunda olan IS1081 de *M. tuberculosis* komplekste bulunmaktadır. Çoğunlukla değişmeden her genomda 5–7 kopya halinde bulunmaktadır. Transpozisyonel aktivitesinin az olması ve kopya sayısının IS6110'dan daha düşük olması nedeniyle sınırlı DNA polimorfizmi oluşturur, epidemiyolojik çalışmalarda kullanımını sınırlıdır. IS1547 ve IS-like element her genomda bir veya iki kopya halinde bulunmaktadır. IS6110 ile kıyaslandığında, IS1547-RFLP'nin ayırım gücü düşüktür. IS6110 enterobakteriyel IS3 ailesine ait 1361 baz çiftlik bir yerleşim elementidir. *M. tuberculosis* kompleksinde yeri ve sayısı (0–25 kopya) değişkenlik göstermekle birlikte çoğunlukla 8–15 kopya halinde bulunur. Bu yöntem *M. tuberculosis* tiplendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Burada öncelikle bakteriyel kültürden DNA elde edilmekte ve kromozomal DNA'daki IS6110 bölgeleri *PvuII* enzimi ile kesilmekte, ardından elektroforez yapılarak bantların ayrışması sağlanmaktadır. Alkali ortamda denatüre edilen jeldeki DNA, southern blotting yöntemi ile naylon membrana aktarılır. IS6110 içeren parçaları görüntülemek için IS6110 DNA sekansına komplementer 521 baz çiftlik DNA dizgisine sahip peroksidaz işaretli prob, hibridizasyon tamponuna eklenir. IS6110 probu ile hibridize olan *PvuII* ile kesilmiş restriksiyon parçaları kemiluminesans reaksiyon ile görüntülenirler. Elde edilen ısıma x-ray film üzerine aktarılarak sonuçlar yorumlanır. Yöntemin dezavantajı, kültürde üremeye gereksinim duyulması, uzun zaman alması, deneyimli personel ihtiyacı ve en önemlisi de kopya sayısı beş ve daha az olan suşlarda ayırım gücünün yetersiz kalmasıdır. Ayrıca IS6110 kopyası bulunmayan suşlarda sonuç alınamamaktadır<sup>50-52</sup>. IS6110-RFLP tiplendirmesinin hemen sonrasında, bazı *M. tuberculosis* suşlarının ve epidemiyolojik olarak bağlantılı izolatların üreme dönemlerinde kaybedilen IS elemanı transpozonları, DNA parmak izlerinde kaymalara yol açmıştır<sup>53</sup>. Bu bulgu, bu yöntemin TB olgularının epidemiyolojik araştırmalarında güvenilirliği açısından tartışma yaratmıştır.

### 2.6.1.1.2. PGRS-RFLP

*Polymorphic GC-rich sequence* (PGRS), tüberküloz kompleksinde en çok bulunan tekrarlanan elementtir. Çok sayıda, 96 baz çifti uzunluğunda G + C'ce zengin uyum diziliminin birbiri arkasına sıralanmış tekrarlarını (*tandem repeats*) içerir. *M. tuberculosis* kompleksi ve diğer mikobakterilerde yaklaşık 30 kadar tekrarlanmaktadır. Bu yöntemde, üzerinde polimorfik GC'den zengin dizi (PGRS) bulunduran ve bir rekombinant plazmit olan pTBN12'nin yerleştirilmesiyle hazırlanan prob kullanılmaktadır. IS6110 kopyası olmayan veya düşük sayıda kopya bulunduran *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesinde ikincil yöntem olarak kullanılmaktadır. pTBN12 parmakizi yönteminde; kromozomal DNA *AluI* enzimi ile kesildikten sonra, agaroz jel elektroforeziyle DNA parçalarının ayrıştırılması yapılmaktadır. Naylon membrana transfer edilen DNA parçalarının gösterilmesinde, kemilüminesan veren maddeyle işaretli prob (pTBN12) kullanılmaktadır. pTBN12; *E. Coli* DH5a'dan izole edilmekte, *EcoRI* ve *HindIII* ile kesildikten sonra yerleştirilen kısım saflaştırılarak prob olarak kullanılmaktadır. Bu prob, *M. tuberculosis* ve diğer mikobakterilerde, her genom üzerinde yaklaşık 30 kez yinelenen PGRS ile hibridizasyona girmektedir. Bu yöntemin tekrarlanabilirliği %100 olarak bulunmuştur. Ayrım gücü de yüksektir. IS6110-RFLP ile aynı dezavantajlara sahiptir. İlave olarak çok fazla sayıda bant elde edilmekte ve bunun sonucu olarak verilerin değerlendirilmesinde sıkıntı oluşmaktadır.

### 2.6.2. Spoligotipleme

*M. tuberculosis* kompleksinde 36 baz çiftlik doğrudan tekrarlayan (*direct repeat* - DR) bölgeler bulunmaktadır. DR bölgesi olarak adlandırılan tek bir genomik bölgede bulunan bu yapıların arasında 35–41 baz çifti uzunluğunda suşa özgü boşluk oluşturan diziler (spacer) bulunmaktadır. Hem DR'lerin sayısı hem de boşlukların varlığı suşlar arasında farklılık gösterir. DR'ler arasında 94 farklı spacer tanımlanmıştır. *M. bovis* BCG aşısı suşu (P3) ve *M. tuberculosis* H37Rv suşlarının DR bölgelerinde bulunan ayırıcı boş bölge sekansları baz alınarak 43 sentetik oligonükleotid tasarlanmış ve bu oligonükleotidler bir DNA membranının üzerine çizgisel olarak yerleştirilmiştir. Araştırılan *M. tuberculosis* kompleks suşunun DR bölgesindeki 43 ayırıcı boş bölgenin incelenmesi için, bu suşun tüm DR bölgesi PZT ile çoğaltılmaktadır. Farklı büyüklükteki PZT ürünleri, sentetik oligonükleotitleri dik olarak kesecek sıralar halinde

membran üzerine aktarılmaktadır. DR primerlerinin bir tanesi biotin ile işaretlenerek streptavidin-peroksidaz konjugatı ve substrat yoluyla sentetik oligonükleotidlerin üzerindeki hibridizasyon membran üzerinde kemilüminesans yöntemi ile gösterilebilmektedir. Ayırıcı dizilimlerin varlığı veya yokluğu dijital olarak gözlenmektedir. Ayırıcı dizilimler suşlar arasında değişim göstermektedir ve hibridizasyon membranının sabitleşme yüzeyinde leke şeklinde görülmektedir. Bu membran en az 20 kere kullanılabilir. Bu yöntemle *M. bovis*, *M. microti* ve *M. canettii* suşları kolayca ayrılabilir. Basit hızlı ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Sonuçlar basit bir bilgisayar programında dijital olarak kodlanarak değerlendirilebilir.

Bu yöntem *M. tuberculosis*'in tiplendirilmesinde IS6110-RFLP'den sonra en yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek kopya sayılı suşlar analiz edildiğinde spoligotiplenmenin ayırım gücü IS6110-RFLP'den daha düşük, düşük kopyalı suşların değerlendirilmesinde ise üstündür. Spoligotiplendirmede IS6110-RFLP'ye göre daha fazla korunmuş genetik bilgi kullanıldığından, bu yöntem, *M. tuberculosis* kompleks izolatlarının takson veya alttürler ayrımında yararlıdır. Spoligotiplendirmenin IS6110-RFLP'den en belirgin üstünlüğü, tek bir deney içerisinde *M. tuberculosis* kompleksinin hem araştırılması hem de tiplendirilmesinin yapılabilmesidir. Ayrıca, canlılığını yitirmiş dokulardan, EZN boyalı preparatlardan ve parafinle işlenmiş örneklerden çalışılabileceği gösterilmiştir.

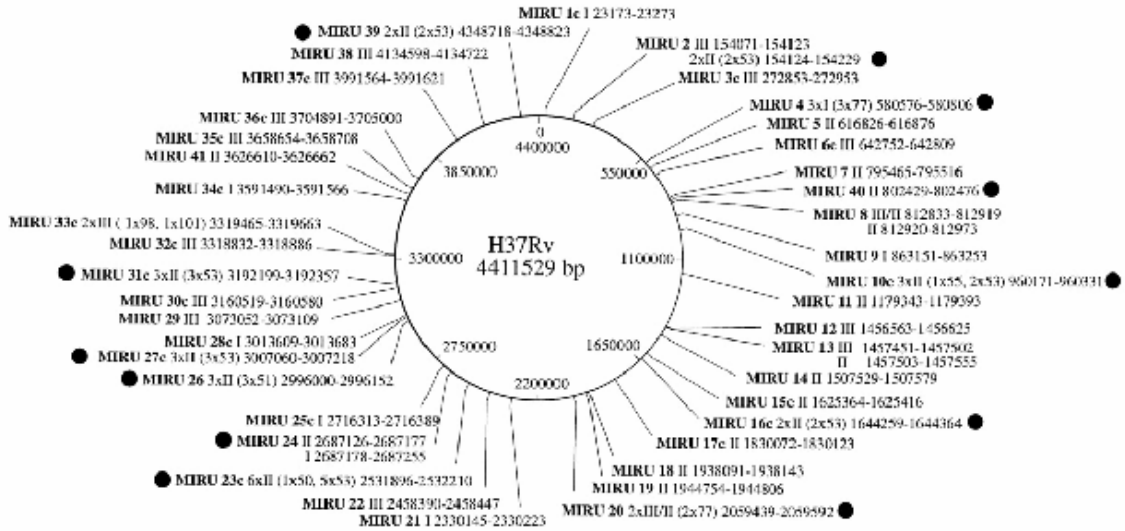
Bununla birlikte, spoligotiplendirmenin IS6110-RFLP tiplendirmesinin yerini alma konusu kuşkuyla bulunmaktadır. IS6110-RFLP tiplendirme paternlerinde belirgin farklılıklar gösteren bazı *M. tuberculosis* suşları benzer spoligopatternler göstermektedir. Ayrıca, spoligotiplendirmenin *M. bovis* izolatlarındaki ayırım gücü PGRS veya DR-bazlı RFLP tiplendirmesine göre daha düşüktür. Buna karşın spoligotiplendirmenin, epidemiyolojik analizlerde uygun bir tarama yöntemi olduğu kabul edilmektedir.

### **2.6.3. *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU) – Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR)***

Değişik sayıda sıralı tekrarlar içeren küçük uyduların (minisatellites) polimorfizmine dayalı bir yöntemdir. Bu bölgeler PZT bazlı olan bu tiplendirme yönteminin temelini oluşturur.

Sıralı tekrar bölgelerinden (*tandem repeat loci*) elde edilen PZT ürünlerinin dizi analizi yapılarak sıralı tekrarların sayısı ve bunların her iki yanında lokalize olmuş DNA parçalarının büyüklüğü belirlenmektedir. *M. tuberculosis* genomunda böyle 41 farklı değişebilen sıralı tekrarlar (*variable tandem repeats*) tanımlanmış ve bunlara MIRU adı verilmiştir.

Genomda bağımsız halde bulunan 24 farklı bölgedeki tekrarlar değerlendirilir. Tekrarlar 52–77 oligonükleotid büyüklüğündedir. PZT ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülür, her bölgedeki MIRU tekrarları bant büyüklüklerine göre değerlendirilir. Sonuçlar 24 rakamlı dijital formata çevrilir. Ayrım gücü yüksek, tekrarlanabilir ve uygulaması kolay, çok merkezli çalışmalara uygun ve otomatize edilebilir bir yöntemdir. Tüberkülozün küresel epidemiyolojik sürveyansı için uygundur. PZT bazlı yöntemler gibi aynı gün içerisinde sonuç verebilmektedir. IS6110-RFLP ve spoligotipleme ile kıyaslandığında, MIRU-VNTR tipleme daha fazla ayırıcı profil oluşturmaktadır. Bu yöntemler, kabul edilebilir uluslararası standart protokolün adaptasyonunu takiben, yakın gelecekte IS6110'u gölgede bırakacaklardır.



Şekil-2 MIRU gen bölgesi dağılımı

#### **2.6.4. *Exact Tandem Repeat (ETR) - VNTR***

VNTR içeren 6 bölgenin (ETR bölgeleri A-F) çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir. ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E bölgelerine özel birer çift primerle çoğaltılmakta ve agaroz jel elektroforezinde ürünün büyüklüğü ve her bölgedeki ETR sayısı belirlenmektedir. Ayrım gücü MIRU-VNTR tiplene yönteminden daha düşüktür.

#### **2.6.5. 16S ve 23S rRNA**

16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin arasında kalan ve suşlar arasında farklılık gösteren bölgelerin çoğaltılması ve sonrasında RE ile kesilerek agaroz jel elektroforezinde oluşan paternlerin belirlenmesi şeklinde uygulanır. Yöntemin tekrarlanabilirliği ve ayrım gücü diğer yöntemlerle kıyaslandığında yetersiz bulunmuştur.

#### **2.6.6. Rasgele çoğaltılan polimorfik DNA (*Random amplified polymorphic DNA -RAPD*)= *Arbitrarily Primed - AP*) PZT**

Bu yöntemde spesifik bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rasgele seçilen bir veya iki primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması esasına dayanır. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık agaroz jel elektroforezinde farklı büyüklükte ve sayıda bantların oluşmasına neden olur. Bu yöntemde kullanılan primerler 10–15 baz çiftlik kısa ve G + C açısından zengindirler. Diğer amplifikasyon şartlarından farklı olarak primerlerin bağlanma ısıları 40-50 C'ye düşürülmüştür. RAPD PZT ürünlerinin genelde küçük (< 2000bp) olması ve primerlerin korunmuş bölgeleri hedef alması nedeniyle *M.tuberculosis* tiplendirilmesinde ayrım gücü oldukça zayıftır.

Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde ortaya çıkan bir mutasyon, suşa özgü bant polimorfizmin oluşmasına neden olur. Elektroforez sonucu ortaya çıkan her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılarak sonuçlar yorumlanır. Uygulama kolaylığı, kısa sürede sonuç alma ve çok sayıda örnek çalışılmasına imkan tanınması nedeniyle geniş kullanım alanı bulmuştur. Ancak en önemli dezavantajı laboratuvarlar arası standardizasyonunun sağlanmamış olmasıdır. Amplifikasyonun erken döngülerindeki tepkime değişimleri, primer / kalıp DNA oranı, kalıp DNA'nın saflığı ve "thermal cycler" cihazında farklı ısı profilleri nedeniyle yinelenebilirlik

azalmaktadır. Bu nedenle, yöntemin güvenilirliği ve kullanılabilirliği tartışma konusu olmuş ve bu yöntemle ilgili ileri çalışmalara gereksinim olduğu belirtilmiştir.

### **2.6.7. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

Bu yöntemde genomik DNA, yüksek molekül ağırlıklı parçalar oluşturan ve kesim alanları sınırlı olan çeşitli RE ile (*EcoR1*, *Ase1*, *Dra1*, *Spe1* ve *Xba1*) kesimin ardından belirli aralıklarla yönü değiştirilen uzun süreli elektrik akımına tabi tutularak bantların ayrışması sağlanır. Etidyum bromür ile boyanan jelde her bir izolata ait tüm bakteri genomunun RE paternleri belirlenir. Birçok bakteri için salgınların araştırılmasında ve popülasyon bazlı çalışmalarda kullanılan moleküler tiplendirmede altın standart kabul edilmektedir. Sınırlı sayıda bant oluşturması ve buna bağlı olarak ayırım gücünün yetersiz olması *M. tuberculosis*'in epidemiyolojik çalışmalarında kullanımını kısıtlamıştır.

### **2.7. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi Alttürlerinin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Yeri**

İnsanlarda TB oluşmasına, sadece *M. tuberculosis* değil, *M. tuberculosis* kompleksi içerisindeki diğer bakteriler de neden olmaktadır. *M. tuberculosis* gibi, *M. africanum* da başlıca primatları enfekte etmektedir. Biyokimyasal olarak *M. africanum*, *M. tuberculosis* ile *M. bovis* arasında bulunmakta ve insanlarda *M. tuberculosis*'le aynı semptomlara neden olmaktadır. *M. tuberculosis* ve *M. bovis*'ten ayırdetmek için kullanılan testlerin değişken sonuçlar vermesi *M. africanum*'un farklı bir tür olması konusunda kuşkular yaratmış, DNA parmak izi yöntemlerinin geliştirilmesi ile açıklığa kavuşmuştur.

IS6110-RFLP tiplendirmesi ile *M. tuberculosis*'in zoonotik yayılımı ortaya çıkarılmıştır. Önceleri küçük kemiricilerin basili olarak bilinen *M. microti*'nin, son zamanlarda, DNA parmak izi yöntemlerinin gündeme gelmesiyle, insanlarda ağır TB formlarına neden olabileceği gösterilmiştir. Tanımlanan *M. microti* suşlarının karakteristik IS6110-RFLP profillerine ve spoligopaternlere sahip olduğu bulunmuş ve insanlarda *M. microti*'den kaynaklanan TB araştırılabilmiştir. Tüm *M. microti* enfeksiyonları, klasik akciğer TB veya hastalığın yaygın formları şeklinde



görülmüşlerdir. *M. microti* tanısı, bu mikroorganizmanın çok yavaş üremesi nedeniyle oldukça sınırlıdır. Bu patojen katı besiyerinde 6–12 haftada, sıvı besiyerlerinde ise daha kısa sürede üreyebilmektedir. İlk izolasyonu katı besiyerinde uygulanan çoğu laboratuvarında, kültürler bu bakterinin üremesinin gözleneceği zamana kadar inkübe edilmemektedir. Bu nedenle, mikroskopik olarak pozitif, fakat kültür negatif sonuçlar görülebilmekte, özellikle kemirici prevalansının yüksek olduğu bölgelerde sanıldığından daha fazla *M. microti* enfeksiyonu olduğu düşünülmektedir. *M. tuberculosis* kompleksi içerisinde tanımlanan *M. canetti* en yüksek evrimsel genetik değişkenliği gösteren alttürüdür. Bu bakteri, ilk kez Somali’li genç bir hastadan izole edilmiş, S tipi koloni morfolojisi ve diğer *M. tuberculosis* kompleksi bakterilerinden daha kısa zamanda üremesi ile dikkati çekmiştir. IS1081-RFLP ile yaklaşık 2000 *M. canettii* izolatında 5–7 bant tespit edilmiştir. Buna karşın, birbirinden farklı ve bağımsız kaynaklı üç *M. canettii* suşunda ise sadece bir bant gözlenmiştir. *M. tuberculosis* ve *M. africanum*’un aksine, *M. bovis* çeşitli evcil ve vahşi hayvanlardan oluşan geniş bir konakçı yelpazesinde enfeksiyonlara neden olmaktadır.

*M. bovis*, diğer *M. tuberculosis* kompleksi alttürlerinden biyokimyasal testler ve koloni morfolojisi ile ayrılabilir. Spoligotiplendirmede, çoğu *M. bovis* suşu karakteristik paternler göstermektedir. Bununla birlikte, biyokimyasal testlerle *M. bovis* olduğu düşünülen bazı suşlarda, bunların dışında farklı paternler de tespit edilmiştir. *M. bovis* enfeksiyonları, klasik olarak, enfekte ineklerden insanlara çiğ süt yoluyla geçmekte ve genellikle insandan insana bulaş görülmemektedir. *M. bovis* enfeksiyonları, *M. tuberculosis* enfeksiyonlarından daha sık olarak solunum dışı bölgelerde görülmektedir.

IS6110-RFLP tiplendirmesi *M. bovis* yayılımını araştırmak için en uygun yöntem olmasa da gruplandırılmasında kullanılabilir. İneklerden ve insanlardan izole edilen *M. bovis* izolatlarının büyük bir bölümü sabit bir genomik pozisyonda sadece bir IS6110 kopyası içermektedirler. Diğer evcil ve vahşi hayvanlardan soyutlanan izolatlarda ise, daha yüksek sayılarda IS6110 elemanı tespit edilmiştir. *M. bovis* izolatları için PGRS-RFLP tiplendirmesinin ayırım gücünün yüksek olduğu görülmektedir (4,60). Son zamanlarda, *M. bovis* tiplendirmesinde, spoligotiplendirme ve diğer DNA parmak izi yöntemleri kullanılmaktadır.

Canlı BCG aşısı, atenüe *M. bovis* suşundan elde edilmektedir. Moleküler yöntemlerle bu suşların da TB enfeksiyonuna neden olduğu kanıtlanmıştır. Karakteristik IS6110 ve IS1081 paternleri BCG izolatlarının tanımlanmalarını sağlamaktadır. Hastalardan soyutlanan *M. bovis* BCG izolatlarının tanımlanmasıyla, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde yaygın TB formlarına neden olabileceği gösterilmiştir. Önceleri, BCG kaynaklı TB enfeksiyonlarının atenüe bakterilerle aşılamaadan uzun bir süre sonra, endojen reaktivasyonlara bağlı olduğu düşünölmekteydi. Son yıllarda, iyatrojenik yol olarak adlandırılan diğer olası enfeksiyon kaynağı gündeme gelmiştir. Günümüzde mesane kanserinin tedavisinde sıklıkla kullanılan çok sayıda canlı bakteri içeren liyofilize BCG, sıklıkla diğer hastalara uygulanacak kemoterapötiklerle aynı güvenlik kabinlerinde hazırlanmaktadır. Kanser tedavisi uygulanan hastalar için kullanılan BCG bakterilerinin DNA parmak izleri ile hastalardan izole edilenler karşılaştırıldığında bazı enfeksiyonların hastane eczanelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Grubu

Çalışmada Aralık 2010 - Şubat 2012 tarihleri arasında Adana bölge tüberküloz laboratuvarına gönderilen; Adana (beş dispanser ve iki yataklı hastane), Mersin (dört dispanser) , Kahramanmaraş (iki dispanser), Osmaniye (bir dispanser), Antakya (iki dispanser), Kilis (bir dispanser), Gaziantep (iki dispanser)'e Fakültesi Hastaneleri'ne başvuran tüberküloz ön tanılı hastalara ait klinik örneklerden izole edilen 25 çoklu ilaç dirençli (ÇİD), (sekiz'i yalnız RIF dirençli) ve 25 duyarlı *M. tuberculosis* izolatu kullanıldı. İzolatların kültürü Lowenstein-Jensen (L-J) besiyerinde ve BACTEC-TB 960 (MGİT) otomatize sistemi kullanılarak yapıldı. İdentifikasyonda üreme özellikleri fenotipik testler, BD identifikasyon kartları ve hsp65 RFLP yöntemi kullanıldı.

#### 3.2.Duyarlılık testleri

##### 3.2.1.MGİT 960 Sistemi ile antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi

###### 3.2.1.1. Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması

Antibiyotikler MGIT SIRE kiti içinde liyofilize halde üretici firma tarafından sağlandı. Liyofilize halde bulunan bu ilaç şişeleri sulandırılarak stok solüsyonlar hazırlandı. Her liyofilize antibiyotik şişesine 4 mL steril distile su eklendi ve tamamen çözünene kadar karıştırıldı.

###### 3.2.1.2. Antibiyotikli ve antibiyotiksiz MGIT tüplerinin hazırlanması

Her test için 5 adet MGIT tüpünü alındı ve üzerleri yazıldı. (Kontrol-K, diğerlerine S, I, R ve E olarak). Her tüpe aseptik şartlarda 0,8 ml BACTEC MGIT 960 SIRE Supplement (Oleic acid,dextros, catalase, bovine albumin, polyoxethylene stearate) eklendi. Dört SIRE tüpünün her birine aseptik koşullar altında, firma önerileri doğrultusunda sulandırılmış liyofilize ilaç solüsyonlarından bir mikropipet yardımı 100 µL eklendi. Kontrol tüpüne antibiyotik eklenmedi.

**Tablo 3.1.**MGİT Tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları

İlaç	Liyofilize Antibiyotik içeren flakon	Sulandırım sonrasında konsantrasyon	MGİT tüplerine eklenmesi gereken volüm	Son konsantrasyon
MGİT SM	332µg	83 µg/ml	100 µl	1.0 µg/ml
MGİT INH	33.2 µg	8.3 µg/ml	100 µl	0.1 µg/ml
MGİT RIF	332 µg	83 µg/ml	100 µl	1.0 µg/ml
MGİT EMB	1660 µg	415 µg/ml	100 µl	5.0 µg/ml

Çalışmada İnokulum hazırlarken pozitif MGİT tüpleri kullanıldı. Firma önerilerine göre bir MGİT tüpü, MGİT 960 cihazında pozitif olduktan sonraki gün (1.gün) dahil 5. güne kadar kullanılabilir. Çalışmada eğer 5 günden daha fazla pozitifliği olan tüp varsa yeni bir MGİT tüpüne subkültürü yapıldı ve pozitif oluncaya kadar takip edildi 1-5. günlerde antibiyogram için kullanıldı. Tüplerin pozitif olduğu gün 1-2 günü geçmemişse tüpler doğrudan iyice karıştırılıp, inokulum olarak kullanıldı. Eğer tüpler 3-5 gündür pozitifse serum fizyolojikle 1/5 dilüe edildi ve bu süspansiyon inokulum olarak kullanıldı.

#### **3.2.1.4. İnokülasyon:**

Üzerleri etiketlenmiş dört ilaçlı MGİT tüpünün her birine (S, I, R, E) inokulum süspansiyonundan 0.5 mL eklendi. 1/100'lük kontrol süspansiyonu hazırlamak için 9.9 mL steril SF içine 0.1 mL mikroorganizma süspansiyonu eklenip iyice karıştırıldı. 1/100'lük kontrol süspansiyonundan kontrol olarak etiketlenmiş MGİT tüpüne 0.5 mL eklendi. MGİT 960 cihazına kayıtları yapıldı ve yerleştirildi. İnokulum süspansiyonundan % 5 koyun kanlı agara 0.1 mL ekilip, 35-37°C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. Plaklar 48. saatte kontrol edildi. Kanlı agar plağında üreme yoksa teste devam edildi, üreme varsa test tekrar edildi.

### **3.2.1.5. Sonuçların yorumlanması ve rapor edilmesi:**

Her ilaçlı tüp ve kontrol tüpleri MGIT 960 cihazına bağlı “*Epicenter Okuyucusu*” ile günlük olarak üreme indeksi (GU) ile takip edildi. Testleri sonuçlanan örnekler dirençli ya da duyarlı olarak MGIT 960 cihazı tarafından yorumlandı. Kontrol tüpünde 4 günden önce 400 GU üreme gözlenmesi kontaminasyonu ya da inokulum fazlalığı şeklinde yorumlandı ve antibiyogram tekrar edildi. On üç günden sonra üreme gözlenmeyen (400 GU) kontrol tüpleri ise bakteri yoğunluğu yetersiz olarak değerlendirildi ve antibiyogram yeniden yapıldı.

### **3.2.1.6. Kalite Kontrol**

Duyarlılık testlerinde kalite kontrol olarak, 4 major antibiyotiğe de hassas olduğu bilinen *M. tuberculosis* ATCC 27294 (H37Rv) suşu kullanıldı.

### **3.2.2. 24 Lokus MIRU VNTR analizi**

#### **3.3.2.1.DNA izolasyonu; mickle ile ekstarksiyon**

MGIT ve LJ sıvı ve katı besiyerleri kullanılarak üretilen *M. tuberculosis* izolatlarından “Mickle” yöntemi (Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.) ile ekstraksiyon yapılarak DNA elde edildi. Ekstraksiyon sonrası spektrofotometre (CHEBIOS) ile DNA ölçümü yapılarak yeterli ve eşit miktarda DNA bulunduğu kontrol edildi.

#### **3.3.2.1.1.MGIT’da üreyen Mikobakterilerin ekstraksiyonu**

Sıvı besiyerinde üreyen ve tiplendirme ile *M.tuberculosis* kompleks (MTC) olduğu belirlenen izolatlarının DNA ekstraksiyonu aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1. Üreme tesbit edilen kültürlerden MGIT sıvı besiyerinden 0,5ml temiz bir eppendorf tüp içerisine alındı,
2. 80 C°’de 15 dk. Isı bloğunda bekletildi,
3. Isı bloğundan çıkartılan eppendorfların biraz soğuması beklenerek 13500 rpm’de 15dk. santrüfuj edildi,
4. Santrifüjeden çıkartılan eppendorf tüpler dikkatlice açılarak süpernatantları atıldı,

5. Pellet üzerine 0,5 ml TE buffer eklenir ve tekrar santrifüj edilerek bir kere daha yıkandı,
6. Eppendorf tüpler üzerinden yine süpernatant atıldı ve üzerine 150µ asitle yıkanmış cam boncuk (SIGMA acid washed glass beads) ve 250µl TE buffer eklendi,
7. Eppendorf tüplerin ağızları sıkıca kapatılarak Mickle cihazına yerleştirildi ve iki dakika yüksek hızda parçalanmaya bırakıldı,
8. Mickle cihazından dikkatlice çıkartılan eppendorf tüpler, 13500 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi,
9. Eppendorf tüplerin ağızları dikkatlice açıldı ve süpernatant temiz bir eppendorf tüp içerisine alındı.



**Şekil 3.** Mickle Cihazı

#### **3.3.2.1.2.LJ'de üreyen mikobakterilerin ekstraksiyonu**

LJ besiyerinde üreme tespit edilen ve Erlich Zeel Nelsen yöntemi ile boyanan ve tiplendirme ile MTC olduğu tesbit edilen kolonilerden yapılan DNA ekstraksiyonu aşağıdaki gibi yapılmıştır;

1. LJ'de üreyen koloniden bir öze dolusu alınarak içerisinde 0,5 ml TE buffer bulunan temiz bir eppendorf tüp içerisine eklendi,
2. 80 C°'de 15 dk. Isı bloğunda bekletildi,
3. Isı bloğundan çıkartılan eppendorfların biraz soğuması beklenerek 13500 rpm'de 15dk. santrifüj edildi,
4. Santrifüjeden çıkartılan eppendorf tüpler dikkatlice açılarak süpernatantları atıldı,
5. Pellet üzerine 0,5 ml TE buffer eklenir ve tekrar santrifüj edilerek bir kere daha yıkandı,
6. Eppendorf tüpler üzerinden yine süpernatant atıldı ve üzerine 150µ asitle yıkanmış cam boncuk ve 250µ TE buffer eklendi,
7. Eppendorf tüplerin ağızları sıkıca kapatılarak Mickle cihazına yerleştirildi ve iki dakika yüksek hızda parçalanmaya bırakıldı,
8. Mickle cihazından dikkatlice çıkartılan eppendorf tüpler, 13500 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi,
9. Eppendorf tüplerin ağızları dikkatlice açıldı ve süpernatant temiz bir eppendorf tüp içerisine alındı.

### **3.2.2. MIRU-VNTR ve ETR-VNTR gen bölgelerinin PZT ile çoğaltılması**

Bu çalışmada 24 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanıldı. Hedeflenen MIRU lokusları için literatürde belirtilen primerler ile amplifikasyon koşulları kullanıldı. Her bir suşa özgü 24 MIRU lokusunun VNTR sayısının belirlenmesi için 24 PCR reaksiyonu gerçekleştirildi<sup>91,92,93</sup>.

#### PCR reaksiyon karışımı:

dH<sub>2</sub>O 2,170 µl

DMSO (SIGMA) 0,250 µl

2X PCR Master mix 3,125 µl

Forward Primer 0,040 µl

Rewerse Primer 0,040 µl

DNA 0,625 µl

Toplam 6,250 µl

**2X PCR MasterMix** (Fermantas): 4mM MgCl<sub>2</sub>, 1,6 mM dNTP mix (her bir dNTP 0,4 mM) 0,05 u/ µl Taq DNA Polimeraz içermektedir.

Hazırlanan reaksiyon karışımı aşağıdaki thermal cycler'da aşağıda belirtilen ısı, döngü, süre ve sayısında amplifiye edildi.

94° C 5dak.

95° C 30 sn.

62° C 60 sn. 40 siklus

72° C 90 sn.

72°C 10 dak.

+4 °C ∞

**Tablo-2.** Primer dizisi

Set and multiplex	Locus	Alias(es)	Repeat unit length (bp)	PCR primer pairs (5_ to 3_, with labeling indicated)
<b>Discriminatory</b>				
<b>Mix 1</b>	580	MIRU 4; ETR D	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGCCAGC
	2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)
	802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
<b>Mix 2</b>	960	MIRU 10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
	1644	MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)
	3192	MIRU 31; ETR E	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
<b>Mix 3</b>	424	Mtub04	51	CTTGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGATTCTTC (FAM)
	577	ETR C	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
	2165	ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT



<b>Mix 4</b>	2401	Mtub30	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
	3690	Mtub39	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
	4156	QUB-4156	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (NED)
<b>Mix 5</b>	2163b	QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)
	1955	Mtub21	57	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA
	4052	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT (NED) CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT
<b>Auxiliary Mix 6</b>	154	MIRU 2	53	TGGACTTGACGAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAT (FAM)
	2531	MIRU 23	53	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG (VIC) AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTGTC
	4348	MIRU 39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (NED)
<b>Mix 7</b>	2059	MIRU 20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
	2687	MIRU 24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (VIC)
	3007	MIRU 27; QUB-5	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)
<b>Mix 8</b>	2347	Mtub29	57	GCCAGCCGCGTGCATAAACCT (FAM) AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
	2461	ETR B	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (VIC) CGACGGGCCATCTTGATCAGCTAC
	3171	Mtub34	54	GGTGCACCTGCTCCAGATAA (NED) GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC

1000 (bp)büyükliğindeki Rox-labeled MapMarker Standard (Bioventures) ve analiz için electrophoresis-based ABI 370 sekans cihazı kullanıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

ABI 370 sekans cihazı verilerine göre bantlar moleküler büyüklük göstergesi ile karşılaştırılıp değerlendirildi. Bu işlem her izolat ve her primer için ayrı ayrı yapıldı.

**En sık karşılaşılan genotiplerin T1 kümesinde yer aldığı, bunu sırası ile LAM7 TUR, EAI5, H3, CAS1-Delhi, MANU 1, H4, ve Beijing ailelerinin izlediği görüldü.**

Dirençli suşlarda en sık T1(10), LAM7 TUR (6), CAS1-Delhi (4), EAI5 (3), Beijing (1), H3(1) görülürken, duyarlı suşlarda T1 (11), LAM7 TUR (4), CAS1-Delhi (2), EAI5 (2), H3 (4), MANU1 (1), H4 (1) görülmüştür.

**Tablo 2.** En sık görülen aileler ve MIRU gen bölgelerinin tekrar sayıları

A i l e l e r	1 5 4	4 2 4	5 7 7	5 8 0	8 0 2	9 6 0	1 6 4 4	1 9 5 5	2 0 5 9	2 1 6 3	2 1 6	2 3 4	2 4 0	2 4 6	2 5 3 1	2 6 8 7	2 9 9	3 0 0	3 1 7 1	3 1 9	3 6 9	4 0 5	4 1 5	4 3 4 8
<b>T1</b>																								
1	1	3	2	2	4	4	3	3	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	6	2	2
2	1	1	2	2	4	4	3	3	2	2	2	4	1	2	5	1	5	3	3	2	2	5	2	2
3	2	4	2	2	4	2	3	2	3	2	2	5	3	1	5	2	2	3	2	2	2	5	4	3
4	1	1	3	2	4	2	2	2	3	4	2	9	2	3	1	3	1	3	2	4	3	5	4	3
5	1	1	3	2	2	2	2	2	3	4	2	10	2	4	1	3	1	3	2	5	3	5	4	3
6	1	1	2	2	4	2	4	2	3	2	2	4	2	3	5	3	2	7	2	3	3	5	4	3
7	1	3	3	2	4	2	4	2	3	2	2	7	2	2	1	3	2	3	2	3	4	5	3	3
<b>Lam 7-TUR</b>																								
9	2	4	4	1	2	5	1	2	2	2	3	4	4	2	5	1	1	3	3	3	3	6	3	2
10	2	4	4	1	2	5	1	3	2	2	3	4	4	2	5	1	1	3	3	3	3	7	3	2
<b>EAI5</b>																								
11	2	2	2	4	3	4	3	3	2	8	8	3	2	4	6	1	2	3	3	4	5	4	1	1
12	2	2	4	4	3	4	2	5	2	2	7	3	2	5	5	2	2	3	3	5	4	5	1	3
13	2	2	4	6	3	4	2	5	2	2	7	3	2	4	5	2	2	3	3	5	5	6	1	3
14	2	2	4	5	3	4	3	4	2	3	6	3	1	4	6	2	2	3	3	5	4	6	1	3
<b>H3</b>																								
15	2	1	3	2	3	5	3	3	2	3	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	3	5	3	2
16	2	2	3	2	3	5	3	3	2	4	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	3	5	3	2

17	2	3	3	2	3	5	3	3	2	4	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	3	5	3	2
18	2	2	3	2	4	5	3	3	2	6	3	2	4	2	4	1	5	3	3	3	3	7	3	2
19	2	2	3	2	3	5	3	3	2	3	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	3	3	3	2
<b>BELING</b>																								
	2	4	4	2	3	3	3	5	2	6	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	3
<b>CAS1-DEIHI</b>																								
	2	4	2	2	3	6	4	5	2	2	4	4	2	2	5	1	9	3	3	4	3	8	4	3
	2	5	2	2	3	5	4	4	2	2	4	4	2	2	6	1	7	3	3	5	2	8	4	2
	2	5	2	2	3	5	2	4	2	2	4	4	2	2	6	1	7	3	3	5	2	8	4	2

## 5. TARTIŞMA

Tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen tüberküloz, tüm dünyada AIDS'den sonra erişkinlerde en çok ölüme yol açan ikinci enfeksiyon hastalığı olarak önemini korumaktadır<sup>81</sup>. Tüberkülozla etkin bir mücadele için hızlı ve duyarlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesinin yanı sıra son yirmi yılda, daha yüksek ayırım gücüne sahip moleküler epidemiyolojik yöntemlerin geliştirilmesi araştırmacıların ilgi odağı olmuştur.

Dünyadaki aktif tüberkülozlu hastaların % 86'sı gelişmekte olan ülkelerde yaşamakta olup tüberkülozdan ölümlerin % 95'i yine bu ülkelerde görülmektedir. Çoğu Afrika ve Güney Doğu Asya'da yer alan gelişmekte olan bu 22 ülkede yaşayan hastaların ancak yarısından azı tanı alabilmekte, tanı alanların da yarısından azı tedavi edilebilmektedir. Ayrıca, gelişmiş ülkelerde enfekte bireylerin % 80'i 50 yaş ve üzerindeki yaş grubunda yer alırken, gelişmekte olan ülkelerdeki hastaların % 77'si en üretken yaş grubu olan 15-50 yaş grubunda bulunmaları bu ülkelerde zaten yetersiz olan üretim kaynaklarını sıkıntıya sokmaktadır<sup>83</sup>.

Son 30 yıl içinde sosyoekonomik sorunlar, göçler, tüberküloz kontrol programlarının ihmal edilmesi bölgesel savaşlar veya iç karışıklıklar sebebi ile yaşanan kitlesel göçler ve özellikle de HIV/AIDS salgınının ortaya çıkmasıyla gelişmiş birçok ülkede tüberküloz insidansında artış olmuştur. Kötü kontrol programları sonucunda ilaç direnci yaygınlaşmış ve bazı bölgelerde ortaya çıkan çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis* Beijing ailesi gibi bazı genotipler, bölgeleri dışına taşınmış ve tüm dünyada halk sağlığı için önemli bir tehdit niteliği kazanmıştır<sup>81</sup>.

Dünyada Tüberküloz kontrol programları yeniden önem kazanan tehdidi kontrol altına almaya yönelik olarak yeniden revize edilmiştir. Bu revizyonda tanıda duyarlılığın artırılması tedavinin sağlık personeli gözetiminde tamamlanması ve MTK suşlarının ülkeler ve bölgeler arası hareketlerinin izlenmesi ana ilke olarak belirlenmiştir. MTK suşların izlenmesinde fenotipik karakterlere dayalı ayırımın yerini genotipik özelliklere dayalı spoligotipleme ve MIRU-VNTR gibi moleküler bazlı yöntemler almıştır. Bu yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda iyi kontrol programı

uygulanan ülkelerde Beijing suşlarının oldukça düşük oranlarda görüldüğü tespit edilmiştir. Nitekim Lari N. ve arkadaşlarının 2005 yılında İtalya-Tuscany de hastanede yatan hastalardan 1 yıl boyunca topladıkları 248 MTK izolatını Spoligotyping metodu ile değerlendirdikleri çalışmalarında, 116 izolatın tek üyeli özel küme ve 12 izolatın tanımlanamayan izolatlar olduklarını, 166 izolatın ise 34 küme (% 67) oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu grup T1 ailesini % 11,6 oranı , H3 ailesini % 7,2 ve LAM9 ailesini % 5,2 oranları ile Tuscany de en baskın görülen 3 spoligotyping ailesi olarak tanımlamışlar, Beijing ailesine ait 7 (% 2,8) suş tespit etmişlerdir<sup>94</sup>. *M. tuberculosis* için riskli ülkelerin yer aldığı Afrika boynuzu ülkelerinden Kampala Uganda'da, Asimwe BB. ve arkadaşlarının (2008) 18 yaş ve üzeri hastalardan izole edilen 344 suşu spoligotyping metodu tiplendirdikleri çalışmalarında, izolatların 33 spoligo kümesi içerisinde yoğunlaştıklarını, 57 izolatında özel spoligotyping paterni verdiklerini tespit etmişlerdir. Bu grup en sık görülen ailelerin, % 70 oranında (241 suş) T2, % 3,5 oranında CAS1-Kili, % 2,6 oranında LAM9 ve % 2,6 oranında CAS1-Delhi aileleri olduğunu bildirmişler. % 1,2 (4 suş) oranında Beijing genotipi bildirilen bu çalışmada suşların % 26,7 sinin HIV seropozitif hastalardan izole edildiği, % 8,1'inin INH ve % 4,4'ünün de RIF dirençli olduğunu bildirilmiştir<sup>95</sup>.

Molina-Torres ve arkadaşlarının 2010 yılında Monterrey Meksika'da yaptıkları çalışmada, Monterrey'in kırsal bölgelerinden toplanan 180 *M. tuberculosis* izolatını Spoligotyping metodu ile genotiplendirmişlerdir. Bu grup sonuç olarak 176 izolatın 44 spoligo international tipe ait olduğunu 4 izolatın ise SpolDB4 te karşılığı olmayan orphan tipler olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca en sık görülen gen ailesinin 43 (% 23,8) suş ile T1 , ikinci sıklıkta görülen aileninde ise 28 (% 15,5) suş ile X1 ailesi olduğunu bildirmişlerdir.

Bölgemiz coğrafyasında yer alan ülkeler arasında *M. tuberculosis* kompleksi üyelerinin moleküler epidemiyolojik yöntemler kullanılarak izlendiği çalışmaların sayısı oldukça sınırlı olup, çoğunluğu son bir kaç yıl içerisinde yapılmıştır. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar beklendiği gibi batı komşularımızda sınırlı sayıda bildirilmesine karşılık doğu komşularımızda Beijing genotipinin giderek artan sıklıkta görülmeye başladığını ortaya koymaktadır. Nitekim Bulgaristan' ın farklı bölgelerinden izole edilen 113 *M. tuberculosis* suşunu, Spoligotyping ve MIRU-VNTR metodu ile genotipik özellikleri yönünden değerlendiren Valcheva V. ve arkadaşları (2008),

Spoligotyping uygulaması sonucunda 2-29 suş içeren 15 küme elde etmişler ve 5 suşun tek üyeli özel küme oluşturduklarını görmüşlerdir. En büyük kümenin % 25,7'lik oran ile T1(ST53) ailesi suşlarına ait olduğunu, LAM7 TUR (ST41) ailesinin % 5,4 oranı ile 2. sırada yer aldığını bildirmişlerdir. LAM7 TUR prevalansının dünya ortalamaları üzerinde bulunmasını Türkiye ile komşuluğuna bağlayan araştırmacılar, *M. tuberculosis* genotiplerinin yayılımında göçlerin önemine dikkat çekmişlerdir<sup>97</sup>.

Gencer B., Shinnick TM. ve arkadaşları da 2005 yılında İran ve komşu ülkelerinde bulunan *M. tuberculosis* suşlarının spoligotyping paternlerini belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada İran ve Afgan tüberküloz hastalarına ait örneklerden 1,742 *M. tuberculosis* suşu izole etmişler ve sonuçları Türkiye ve Pakistan ile karşılaştırmışlar. T, CAS, EAI ve LAM ailelerinin baskın olduğunu görmüşlerdir. İran'da %32,3 ve Türkiye'de % 36,5 oranları ile T ailesi, Pakistan'da % 61,3 ve Afganistan'da % 27,4 oranları ile CAS ailesinin baskın olduğunu, % 1,8 (7 suş) oranında Beijing genotipine ait izolat bildirmişlerdir. Pakistan ve Afganistan'da bulunan suşların çoğunluğunun atasal suşlara, Türkiye'de bulunanların modern TB suşlarına ait olduğunu, İran'da ise atasal ve modern TB suşlarının eşit oranda görüldüğünü belirtmişlerdir<sup>98</sup>. Diğer taraftan Rohani M. ve arkadaşları (2009) İran-Horasan bölgesinden topladıkları 113 *M. tuberculosis* izolatını değerlendirdikleri çalışmalarında, birden fazla izolatın 17 spoligo kümesi içerisinde toplandığını, 57 izolatın tek üyeli özel kümeler oluştururken, 32 izolatın spoligotyping uygulaması sonucunda tespit edilemeyen orphan patern olduğunu bildirmişlerdir. Bu grup en büyük kümenin 13 suş içeren orphan paternden oluştuğunu, Beijing genotipinin % 7,1 oranında olduğunu bildirilmişlerdir. Nieman S. ve arkadaşları 2010 yılında Gürcistan'da Beijing ailesinin yayılımını araştırdıkları çalışmada Spoligotyping metodu ile 183 *M. tuberculosis* izolatını değerlendirmişlerdir. Bu grup değerlendirdikleri suşların % 26'sinin Beijing, % 18'inin LAM, % 12'sinin Ural ve % 5'inin de Haarlem ailelerine ait olduklarını göstermişlerdir<sup>92</sup>.

Sınırlı sayıda da olsa bu literatür verileri tüm dünyada olduğu gibi bölgemiz ülkelerinde de *M. tuberculosis* Beijing suşlarının giderek artan oranlarda görülmeye başladığını göstermektedir. Tüberküloz ülkemizde 1940-50'li yıllarda uygulanan sıkı kontrol programları ile kontrol altına alınmışken elde edilen başarıya duyulan güven sonucu programların gevşetilmesi ile birlikte tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de

yeniden artış trendine girmiştir. Özellikle düşük sosyoekonomik seviyeye sahip olup tüberküloz insidansının ve çeşitliliğinin fazla olduğu Güney Doğu Anadolu bölgesine komşu olan Çukurova bölgesi riskli bölgeler arasında yer almaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda Güney Doğu Anadolu bölgesinde varlığı bildirilen *M. tuberculosis* Beijing suşu bölgemizi de tehdit etmektedir. Bu bağlamda bölgemizde salgın veya sporadilere sebep olan tüberküloz suşlarının klonal düzeyde takibi bir taraftan reinfeksiyon ve reaktivasyonun tespiti yolu ile tedavi başarısını diğer taraftan da bölgemizdeki MTK popülasyonunun yapısı ve bu popülasyona olması muhtemel yeni girişlerin tespiti ile kontrol programlarının başarısını göstermesi açısından son derece önemlidir. Ancak bölgemizde daha önce klonal düzeyde suş tanımlaması yapabilen moleküler yöntemlerin kullanımı ile gerçekleştirilen böyle bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada 24 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanılarak tüberküloz epidemiyolojisinin bölgemizdeki yapısı hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilecek bilgilerin, bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı ve yıllık epidemiyolojik bulgularla bu güne ait bulguların kıyası ile bölgemizdeki tüberküloz epidemiyolojisinin karakterini ortaya koyacağı düşünülmüştür. Bu amaçla Çukurova bölgesinde bulunan 7 ilde *M. tuberculosis* klinik yakınması olanlar ile bu hastalarla yakın temas riski taşıyanlardan alınan balgam, bronkoalveoler lavaj ve ince iğne biopsi örneklerinden izole edilen ve illere göre kabul edilen örnek sayısının baz alınarak randomize seçilmiş 50 MTK suşu değerlendirilmiş, suşlardan . Kümeleşme oranının % 97,9 olduğu görülmüştür.

Bölgemizde egemen suşun T1 ailesine ait suşlar olduğu, bunu LAM7 TUR ailesinin izlediği ve Urfa örnekleri dışında Beijing ailesinden suşların diğer illerimizde henüz görülmediği tespit edilmiştir. Bu bulgular bölgemizin, ülkemizin farklı bölgelerinden toplanan suşlarla yapılan genotiplendirme çalışmalarında elde edilen profile benzer olduğunu göstermiştir.

Ankara ve Malatya bölgesine ait 245 *M.tuberculosis* klinik izolatının değerlendirildiği bir çalışmada Zozio T. ve arkadaşları (2005), Spoligotyping metodu ile 206 izolatın 33 kümede toplandığını, 39 izolatın ise tek üyeli özel kümeler içerisinde yer aldıklarını belirterek, en büyük kümeyi % 21 oranında LAM7 TUR (ST41) ailesinin oluşturduğunu bunu sırası ile % 16,3 oranı ile T1(ST53) ve % 5,3 oranı ile Haarlem 3 (ST50) ailelerine ait kümelerin izlediğini bildirmişlerdir<sup>84</sup>. Günel.S (2006) ve

arkadaşları Malatya'da 450 *M.tuberculosis* izolatını değerlendirdikleri çalışmada T süper ailesinin % 38,6 ile bölgede en sık karşılaşılan aile olduğunu bunu, % 27,3 ile LAM7 TUR ve % 14,8 oranı ile Haarlem ailelerine ait suşların izlediğini bildirmişlerdir. Bu grup Beijing genotipinden 4 ve Hindistan'ın Delhi bölgesine özgü CAS1-Delhi genotipinden 2 suş tespit etmişlerdir. Aynı bölgede bir yıl ara ile yapılan ikinci çalışmada Durmaz R. (2007) ve arkadaşları değerlendirdikleri 145 *M. tuberculosis* suşundan 120'sinin, üye sayıları 2-33 arasında değişen 19 kümede toplandığını ayrıca tek üyeli özel küme oluşturan 25 suş tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu grup Günel S. ve arkadaşlarının bulgularından farklı olmak üzere, suşların % 23,9'unun LAM7 TUR ailesi içerisinde yoğunlaştığını bunu % 22,5 oranı ile T1 ailesine ait suşların izlediğini bildirmişlerdir. Bu grup çalışmaya dahil ettikleri suşlardan 142'sini 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile klonal düzeyde tekrar değerlendirmişler ve sonuç olarak 98 izolatın 21 küme içerisine dağıldığını, kümeleme oranı % 69 olduğunu ve 44 (% 31) izolatın ise tek üyeli kümelerde kaldıklarını belirtmişlerdir.

Bize komşu bölgelere ait bu çalışmalardan, Günel S. ve arkadaşlarının kendi izolatlarından elde ettikleri klonal dağılım sıralaması bizim sıralamamızla benzerlik göstermekle birlikte, oranlarımızdaki farklılık dikkat çekicidir. Günel S. ve arkadaşları Malatya bölgesi izolatları arasında en sık karşılaştıkları genetik klonun % 38,6 ile T ailesine ait suşlardan oluştuğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da tespit edilen en büyük gen kümesi T ailesi suşları kümesidir, ancak bu suşlar tüm suşların % 51,9'unu oluşturmuştur. Buna karşılık Durmaz R. ve arkadaşları, Günel S. ve arkadaşları gibi Malatya bölgesinden izole edilen suşlarla ve aynı yöntemleri kullanarak yaptıkları çalışmada en büyük kümeyi % 23,9' luk oran ile LAM7 TUR ailesi suşlarının oluşturduğunu, T ailesinin ise % 22,5 ile 2. sırada yer aldığını bildirmişlerdir. Yine Zoio ve arkadaşları da Malatya bölgesi ağırlıklı izolatları değerlendirdikleri çalışmalarında, Durmaz R. ve arkadaşları gibi en büyük kümeyi % 21 oranı ile LAM7 TUR ailesinin oluşturduğunu belirtmişlerdir <sup>84,85</sup>. Oysa bizim çalışmamızda LAM7 TUR ailesi suşları % 11,5 oranı ile 2. büyük kümeyi oluşturdu. Bu sonuçlar bizim bulgularımızla farklılık göstermektedir. Ancak Malatya ve Malatya ağırlıklı bölgesel suşların değerlendirildiği ve 1 yıl ara ile yapılan iki çalışmada bile suş popülasyonunda farklılıkların tespit edilmesi hem tüberküloz toplum etkileşiminin son derece değişken olduğunu göstermekte hem de moleküler epidemiyolojik çalışmalara duyulan ihtiyacın



gerekçesini ortaya koymaktadır. Ancak bölgeye ait aynı moleküler epidemiyolojik yöntemlerin kullanıldığı bu 4 çalışmanın bir başka önemli çıktısı Malatya bölgesi sonuçları arasında Beijing suşlarının % 0,9 oranında bildirilmiş olmasına karşılık, Çukurova bölgesi illeri olarak kabul edilebilecek Adana, Mersin, Hatay, Osmaniye, Gaziantep ve Kahramanmaraş illeri izolatları arasında Beijing ailesine ait suşların olmamasıdır. Ancak bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz Urfa iline ait izolatlar arasında % 8,4 oranında Beijing suşunun bulunması aslında bu suşların Urfa ve Malatya gibi Güneydoğu Anadolu illerinde bulunduğunu ancak bölgemize henüz girmediklerini göstermesi açısından önemlidir.

Çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis* Beijing genotipinin bölgemizde görülmemiş olmasına rağmen ülkemize girmiş olduğu Köksalan OK. ve arkadaşları (2006 tarafından yapılan çalışmada da ortaya konmuştur. Bu grup, spoligotyping ve 12 lokus MIRU-VNTR metodu kombinasyonunu uygulayarak 4069 izolatı değerlendirdikleri çalışmalarında İstanbul bölgesi izolatlarında Beijing ailesine ait genotiplerin sıklığını % 1,1 olarak tespit etmiştir.

Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada Aktaş E. ve arkadaşları (2008) Zonguldak ilinde izole edilen 128 *M. tuberculosis* suşunu Spoligotyping ve MIRUVNTR metodu ile değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada; kümeleşme oranı % 73 olarak bulunmuş, 94 izolatın 2-25 suş içeren 13 küme içerisinde toplandıkları, 34 (% 26,5) suşun ise tek üyeli özel kümeler oluşturdukları bildirilmiştir<sup>100</sup>. Bu grup Durmaz R. İle Zozio T. ve arkadaşları gibi LAM7 TUR ailesine ait suşların % 19,5 ile en sık karşılaşılan suşlar olduklarını tespit etmişlerdir. Glynn JR. ve arkadaşları da 2006 yılında Beijing genotipinin araştırılması amacıyla Amerika'da yapmış oldukları ve ülkemiz dahil olmak üzere 35 ülkeden 49 araştırma merkezinden toplanan 29,259 klinik izolatını Spoligotyping metodu ile değerlendirdikleri çalışmalarında, ülkemize ait 620 izolat içerisinde Beijing/W oranını % 1 olarak tespit etmişlerdir<sup>101</sup>. Bizim çalışmamız da dahil bölgemiz ve ülkemiz izolatları ile yapılan bu 5 çalışmanın sonuçları kıyaslandığında, bölgemizdeki *M. tuberculosis* genotiplerinin görülme sıklıklarının, LAM7 TUR ve T ailesi arasında değişmekle birlikte, birbirlerine benzerliği en dikkat çekici çıktıdır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bölgemizde bulunan aktif tüberkülozlu hastalardan tanı ve temas öykülü kişilerden tarama amaçlı olarak toplanarak Ç.Ü. THAUM-Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen 25'i dirençli, 25'i duyarlı 50 örnek MTK'inin epidemiyolojik özelliklerini tespit amacı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda;

- a) Bölgemiz genelinde, ülkemizden yapılan çeşitli bildirimlerden farklı olarak LAM7 TUR yerine T1 ailesine ait suşların yoğun görüldüğü,
- b) Çoklu ilaç direnci ile özdeşleşen Beijing grubunun daha önceden yapılan çalışmalarda da bildirildiği gibi Urfa ilinde sınırlı olduğu ve komşu illere taşınmadığı,
- c) Bu suşların daha önce tanımlanmamış bölgesel suşlar olabilecekleri var sayılarak ileri identifikasyon için dizi analizi yöntemi ile yeniden değerlendirilmelerinin uygun olacağı
- e) 24 lokus MIRU-VNTR'ın Spoligotyping yöntemine göre daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu ve spoligotipleme ile elde edilen grupları kendi içerisinde alt gruplara böldüğü, T1 grubu içerisinde 7 MIRU-VNTR alt grubu oluştuğu ve bu alt grupların bölgesel farklılıklar gösterdikleri görülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. **Thomas Dormandy.** A History of Tuberculosis. The White Death The Hambledon Press **1999** London.
2. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html) **WHO Report 2009.** Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning Financing.
3. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye’de Verem Savaşı **2009** Raporu. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı 24 Mart **2009**, Ankara.
4. **Orhan BAYLAN** Extensively Drug Resistant and Extremely Drug Resistant Tuberculosis Forms After Multi-Drug Resistant Tuberculosis: New Faces of the Old Disease derleme **2009**Türkiye Klinikleri
5. **Jain A, Dixit P.** Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? J Biosci **2008**; 33(4): 605-16.
6. **Baylan O, Albay A, Kisa O, Tekbas OF, Deniz O.** Detection of primary drug resistance rates of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated between 2002-2003 years and comparison with the data of 1998- 2001 period. Mikrobiyol Bul **2005**; 39(2): 153-60.
7. **Bengisun J. S., Karnak D., Palabiyikoglu I., and Saygun N.** *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Turkey, 1976-97. Scand J Infect Dis. **2000**; 32:507-510.
8. **Gillespie SH.** Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and molecular perspective. Antimicrob Agents Chemother. **2002**; 46(2):267-74.
9. **Ramaswamy, S. and Musser J.M.** Molecular genetic basis of antimicrobial agentresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuber Lung Dis. **1998**; 79(1):3-9.
10. **Cavusoglu C., Hilmioglu S., Güneri S., and Bilgiç A.** Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. J Clin Microbiol. **2002**; 40(12):4435-4438.
11. **Laennec R.**Treatate de Lauscultaton mediate ve laennec et Boyle: Recherches sur la phytisic pulmonaire. **1810**.
12. **Daniel im. TM** Captain of the Death.The story of tuberculosis. Univesity of Rochester.Press Rochester,New York **1997**.
13. **Dubos R, and J.** The White plaque. Tuberculosis, man and Society. Londen 1. **1953**.
14. **Onat EK.** Osmanlı İmaratorluğunun son 40 yılında Türkiyenin Tüberküloz Tarihçesi. Cerr Tıp Fak.Derg **1879** :10: 273-284.
15. **Barış YL., Hillerdal G.**Tuberculosis in the Ottoman harem in the 19th Century Journal Medical biography **2009**; 17:170-173.
16. **Bardakçı M.** Şahbaba.7 Baskı. Istanbul Fan Yayımcılık, **1999** :388-95.

17. **Yenel F.** Türkiye’de son yüzyılda akciğer tüberkülozu tedavisinde aşamalar. Cerr Tıp Fak. Derg. **1981**; 12: 266-270.
18. **Ahmed N, Hasnain SE.** Genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Old threats & new trends. *Indian J Med Res*, **2004**;207-212.
19. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, Emergency Update 2008. Geneva, World Health Organization, **2006 (WHO/HTM/TB/2008.402)**.
20. **Samç A, Çoban A.** *Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı Kitabı*. Samsun. **1999**
21. **Barış Y.** Çağlar boyu tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. **2003**; 1-7.
22. **Karlıkaya C.** Tüberküloz Ders Notları. <http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernet.htm>. **1998**.
23. **Santo AH.** Deaths attributed to multiple causes and involving tuberculosis in the state of Rio de Janeiro Brazil between 1999 and 2001. *J Bras Pneumol*. **2006**; 32(6):544-52.
24. **Köksal F, Yaman A.** Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. *21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu*, Samsun. **2003**; 34-47.
25. [www.student.cbcmd.edu](http://www.student.cbcmd.edu)
26. **Inderlied CB.** Mycobacteria In: **Armstrong D, Cohen J** (Eds). *Infectious Diseases*, Mosby Company, London. **1999**; 1(8): 1-22.
27. **Kıyan M.** Mycobacteriaceae. **Ustaçelebi S, Cengiz AT** (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi; **1999**; 419-455.
28. **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC.** Mycobacteria. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th Ed. Philadelphia, Lippincott; **1997**; 893-946.
29. **Pfyffer GE, Brown-Elliot BA, Wallace RJ.** Mycobacterium In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller
30. MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington DC: **2003**; 532-559, 1156-1164.
31. **Palomino JC, Leão SC, Ritacco V.** Tuberculosis **2007**.
32. **Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier, T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST.** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci U S A. **2002**; 99(6):3684-9.
33. [www.PLoSPathog.org](http://www.PLoSPathog.org)
34. **Brisse S, Supply P, Brosch R, Vincent V, Gutierrez MC.** ‘A re-evaluation of *M. prototuberculosis*’: continuing the debate. www.PLoS Pathogens.org. **2006**; 2(9): 812-15.
35. **Runyon, E.H.** *Mycobacterium intracellulare*, relationship of ‘atypical’ acidfast bacilli to human disease. *American Review of Respiratory Disease*. **1967**;95: 861- 867.
36. **Wayne LG, Kubica GP.** Mycobacteria In: P.H.A. Sneath, (ed), *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. **1986**; 1435-1457.

37. **Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA.** *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology, *BMC Microbiology*. **2006**; 6:23.
38. **31 Koksalan OK, Kilicaslan Z, Zanlier G,R. Guzel R, Seber E,** Prevalence of Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* strains LUNG DIS in Istanbul. *INT J TUBERC*, **2006**; 10(4):469–472.
39. **Haas DW.** Mycobacterial Diseases In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5nd ed, Philadelphia: Churcill Livingstone, **2000**; 2596-2608.
40. **Schwander SK, Torres M, Seda E,** Enhanced responses to *M. tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*, **1998**; 178: 1434-45.
41. **Kılıçturgay, K.** (editör) *Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. Gediklioğlu, S. Bursa Güneş ve Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, **1994**; Sayfa:65-82.
42. **Murray PR,** (editor in chief) *Manual of Clinical Microbiology* Nolte., FS, Metchock, B. Sixth edition Asm Press Washington D.C., **1995**;400- 437.68
43. **Noss EH, Pai RK, Sellati TJ,** Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19 kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, **2001**; 167: 910-918.
44. **Andersen P, Munk ME, Pollock JM,** Specific immune based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, **2000**; 356: 1099-104.
45. **Çoban H.** *Mycobacterium tuberculosis'* e ait ESAT-6 VE CFP-10 proteinlerinin ekspresyonu, farklı hasta gruplarında IFN- $\gamma$  VE IL-10 yanıtlarının tespiti Uzmanlık tezi, İzmir ,**2007**.
46. **Özbal Y.** Tüberküloz immünolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi*, **2006**; 28 (1): 25-34.
47. **Babacan F, Över U.** Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* complex, In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, **2002**; 538-591.
48. **Rachman H, Strong M, Schaible U, Schuchhardt J, Hagens K, Mollenkopf H, Eisenberg D, Kaufmann SH.** *Mycobacterium tuberculosis* gene expression profiling within the context of protein networks. *Microbes Infect.* **2006**; 8(3):747-57.
49. **Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia EM.** Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol.* **2001**;166(12):7033-41.
50. **Thurnher M, Ramoner R, Gastl G, Radmayr C, Bock G, Herold M, Klocker H, Bartsch G.** Bacillus Calmette-Guerin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *Int. J. Cancer*, **1997**; 70:128–134.
51. **Öztürk R.** Tüberkülozda doğal direnç ve risk faktörleri. *21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı*, Samsun, **2003**; 58-73.
52. **Andersen P, Askggaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I.** Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun*, **1991**; 59 : 1905-10.

53. **Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR.** Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun*, **1991**; 59: 1755-61.
54. **Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V:** Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**; 102:4033-4038.
55. **Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, Klebl B, Thompson C, Bacher G, Pieters J:** Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*, **2004**; 304:1800-1804.
56. **Goren MB, Hart PD, Young MR, Armstrong JA.** Prevention of phagosome lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1976**; 73 : 2510-4.
57. **Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR. Jr:** SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, **2003**; 48:453-464. 69
58. **Smith CV, Huang CC, Miczak A.** Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, **2003**; 278:1735-1743
59. **Geisel RE, Sakamoto K, Russell DG, Rhoades ER.** In vivo activity of released cell wall lipids of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin is due principally to trehalose mycolates. *J Immunol*, **2005**; 174:5007-5015.
60. [www.rshm.gov.tr](http://www.rshm.gov.tr). *Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı* kitabı. **2010**.
61. **Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A.** How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol*, **2006**; 8(11):1687-96.
62. **Ernst, J. D.** Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun*, **1998**, 66:1277–1281.
63. **Pieters J.** Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect.* **2001**; 3(3):249-55.
64. **Gatfield J, Pieters J.** Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, **2000**; 288(5471):1647-50.
65. **Gumperz JE, Brenner MB.** CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol.* **2001**; 13(4):471-8.
66. **Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Safi H, Lakey DL, Mandelboim O, Samten B, Porgador A, Barnes PF.** The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol.* **2002**; 168(7):3451-7.
67. **Ganz T.** Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, **2003**; 3: 710-20.
68. **Raja A.** Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* **2004**; 120(4):213-32. 70
69. **Abebe F, Holm-Hansen C, Wiker HG, Bjune G.** Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol.* **2007**; 66(2-3):176-91.

70. **Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR.** Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* **1998**; 160(11):5448-54.
71. **Barcelos W, Martins-Filho OA, Guimaraes TM, Oliveira MH, Spindola-de-Miranda S, Carvalho BN, Toledo VP.** Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. *Microbiol Immunol.* **2006**; 50(8):597-605.
72. **Liu G, Ren H, Sun XJ, Shi JS.** Distribution of natural killer cells and T-lymphocyte subsets in peripheral blood, gallbladder cancer and surrounding tissue. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* **2007**; 6(1):81-6.
73. **Çilli A.** Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 163-172.
74. **Özışık NÇ.** Çok ilaca Dirençli Tüberküloz Hastalarında BACTEC ve Agar Proporsiyon Yöntemi İle belirlenen Etionamid Direncinin Klinik Önemi. Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul. **2006**.
75. **Kiraz N.** Antitüberküloz İlaçlara Direnç Mekanizmaları ve Yeni İlaçlar, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 173-177.
76. **Çavuşoğlu C.** *Mycobacterium tuberculosis*'de Moleküler Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri, 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 367.
77. **Durmaz R.** *Mycobacterium tuberculosis*'de Direnç Sorunu. *ANKEM Dergisi*, **2005**; 19 (2): 107-110.
78. **Fattorini L, Migliori BG, Cassone A.** Extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis: an old and new threat. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, **2007**; 43(4): 317-319.
79. **Tansel Ö.** Klasik Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım.Samsun. **2003**; 347-351.
80. Global Tuberculosis Control Surveillance, Planing, Financing WHO Report 2008.WHO/HTM/**2008**; 93.
81. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı: Türkiye'de Verem Savaşı 2009 Raporu.Ankara. **2009**.
82. **Bass JB.** *Epidemiology of Tuberculosis*. [www.uptodate.com/subscribers/index.asp](http://www.uptodate.com/subscribers/index.asp).
83. **Özkara S, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H.** Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı, Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı, **2003**.
84. **Zozio T, Allix C, Gunal S, Saribas Z, Alp A, Durmaz R, Fauville M, Rastogi, N. Sola, C.** Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Twocities of Turkey: Description of a New Family of Genotypes That is Phylogeographically Specific for Asia Minor. *BMC Microbiology*, **2005**; 5-44
85. **Günal S.** Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının IS6110RFLP (restriction fragment length polymorphism) ve spoligotyping profillerinin belirlenmesi. doktora tezi. Malatya, **2006**.

86. Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Allix C, Dufaux MF, Rastogi N. Population-Based Molecular Epidemiological Study of Tuberculosis in Malatya, Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, December 2007, p. 4027-4035, Vol. 45.
87. [www.pasteur-guadeloupe.fr](http://www.pasteur-guadeloupe.fr)
88. [www.isogen-lifescience.com](http://www.isogen-lifescience.com)
89. Caugant DA (ed.), Molecular Epidemiology of Microorganisms, *Methods in Molecular Biology*, 2009. Vol. 551- 10.1007/978-1-60327-999-4.
90. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
91. Smittipat N. Three-year population-based evaluation of standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *JCM*. 2005; 43:5034-43.
92. Niemann S, Diel R, Khechinashvili G, Gegia M, Mdivani N, Tan YW. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage favors the spread of multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia. *J. Clin Microbiol*. 2010;48(10):3544-50.
93. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, Hughes S, R. Hewinson G, Neill S. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*, 2002; 148: 519–528.
94. Lari N, Rindi L, Sola C, Bonanni D, Rastogi N, Tortoli E, Garzelli C. Genetic Diversity, Determined on the Basis of *katG463* and *gyrA95* Polymorphisms, Spoligotyping, and IS6110 Typing, of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates from Italy. *J Clin Microbiol*, 2005;1617–1624.
95. Asimwe BB, Ghebremichael S, Kallenius G, Koivula T, Joloba ML. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes and drug susceptibility pattern of isolates from tuberculosis patients in peri-urban Kampala, Uganda. *BMC Infectious Diseases*, 2008; 8:101.
96. Molina-Torres CA, Moreno-Torres E, Ocampo-Candiani J, Rendon A, Blackwood K, Kremer K, Rastogi N, Welsh O, Vera-Cabrera L. *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes in Monterrey, Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010; 448–455.
97. Valcheva V, Mokrousov I, Narvskaya O, Rastogi N, Markova N., Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. *J Clin Microbiol*. 2008;46(9):3005-11.
98. Gencer B, Shinnick TM. Molecular Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Turkey. *Am. J Infec Dis*, 2005;(1), 5-11.
99. Rohani M, Farnia P, Nasab MN, Moniri R, Torfeh M, Amiri MM. Beijing genotype and other predominant *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes observed in Mashhad city, Iran. *Indian J Med Microbiol*, 2009;27:306-10.
100. Aktas E, Zozio T, Cömert FB, Külah C, Aydın O, Rastogi N, Sola C. A first insight into the genetic diversity and population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Zonguldak, Turkey. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007;14-15.
101. Glynn J.R. Beijing/W Genotype *M. tuberculosis* and Drug Resistance European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of tuberculosis. *Emerg. Infect. Dis*, 2006; 736-747.



## ÖZGEÇMİŞ

Şubat 1981'de İran'da doğdu. İlkokulu Müderris İlkokulu'nda 1993 yılında, ortaokulu Şehit Çamran'da ve 1999 yılında liseyi İmam Khomeyni Lisesin'de tamamladı.

Üniversite eğitimini (ön lisans olarak) 2002-2003 yılları arasında Tebriz Azad İslami Veteriner aldıktan sonra 2008-2010 yılları arasında Tebriz Üniversitesi Veteriner Fakültesin'de lisans eğitimini tamamladı.

2011 Bahar döneminde Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.