

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’NİN FARKLI COĞRAFİK BÖLGELERİNDEN
TOPLANAN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
İZOLATLARININ IS6110 RFLP (RESTRICTION FRAGMENT
LENGTH POLYMORPHISM) VE SPOLİGOTİP
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Selami GÜNAL
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Rıza DURMAZ**

MALATYA – 2006

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Selami GÜNAL'a ait bu bilimsel çalışma jüri üyeleri olarak tarafımızdan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

İ M Z A

BAŞKAN
ÜYE
ÜYE
ÜYE
ÜYE

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../2006

Prof.Dr. Tayfun GÜLDÜR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, üstün bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, titiz ve disiplinli çalışmalarından dolayı yanında çalışmaktan onur duyduğum, zamanını, sabrını ve hoşgörüsünü bizden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof.Dr. Rıza DURMAZ'a, eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden hep yararlandığım hocalarım Sayın Prof.Dr. Bengül DURMAZ'a, Doç Dr İbrahim Halil ÖZEROL'a ve zorlukları kolaylaştıran Sayın Yrd.Doç.Dr. Barış OTLU'ya, tüm çalışma arkadaşlarıma, desteği ve sevgisiyle her zaman yanımda olan eşime, canım oğluma ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İç kapak.....	I
Kabul ve onay sayfası.....	II
Teşekkür.....	III
İçindekiler.....	IV
Şekiller dizini.....	V
Tablolar dizini.....	VI
Simgeler ve Kısaltmalar dizini.....	VII
Giriş.....	1
Genel Bilgiler.....	3
Materyal ve Metot.....	23
Bulgular	30
Tartışma	58
Sonuç ve Öneriler.....	64
Özet.....	65
İngilizce Özet.....	66
Kaynaklar.....	67
Ekler.....	73
Özgeçmiş.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo1. Suşların bölgelere ve direnç profillerine göre dağılımı	30
Tablo 2. IS6110 kopya sayısına göre kümeleşme oranı	40
Tablo 3. Düşük kopya sayılı suşların bölgelere göre dağılımı	41
Tablo 4. Bu çalışmadaki 450 suşun spoligotipleme sonuçları ve SpolDB4 veri bankasına göre değerlendirilmeleri	41
Tablo 5. SpolDB4 veri bankasına göre familyası belirlenemeyen 49 suşun hibridizasyon ve oktal kod profilleri	53
Tablo 6. Kendi aralarında 4 küme oluşturan 14 yalnız suşa ait bilgiler	54
Tablo 7. Majör paylaşılan tiplerin (PT) bölgelere göre dağılımı	55
Tablo 8. 450 suşa ait familyalar ve görülme sıklığı	56
Tablo 9. Duyarlı, dirençli ve çoğul dirençli suşlardaki majör spoligotip familyaları	56
Tablo 10. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin tek tek ve birlikte değerlendirilme sonuçları	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
	No
Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı	5
Şekil 2. Ziehl-Neelsen boyama ile mikobakterilerin görünümü	6
Şekil 3. Auramine boyama ile floresan mikroskopta mikobakterilerin görünümü	7
Şekil 4. IS6110 RFLP yönteminin basamakları	19
Şekil 5. Spoligotipleme yönteminin aşamaları	20
Şekil 6. <i>M. tuberculosis</i> genomundaki 41 MIRU bölgesi	21
Şekil 7. IS6110 RFLP profillerini gösteren örnek bir membran	31
Şekil 8. Test edilen 450 suşun Gel ComparII software programı ile yapılan dendogramı	32
Şekil 9. Spoligotipleme yöntemine ait örnek bir membran	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

ARB: Aside Dirençli Bakteri

AARB: Aside Alkole Dirençli Bakteri

ATM: A Tipik Mikobakteri

BSA: Bovin Serum Albumin

BCG: Bacille Calmette-Guerin

CAS: Central Asian

C: Sitozin

CTAB: N-cetyl-N, N, N-trimethyl amonyum bromür

ÇİD: Çoğul İlaç Direnci

DGT: Direkt Gözlem Altında Tedavi

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DNaz: Deoksiribonükleaz

DR: Direct Repeat

DSÖ:Dünya Sağlık Örgütü

EDTA: Disodyum Salt Dihidrat

ETB: Etambutol

ETR-VNTR: Exact Tandem Repeat-Variable Numbers of Tandem Repeats

G: Guanin

HCL: Hidroklorik asit

HIV: İnsan immun yetmezlik virusu

IS: Insertion Sequence

INH: İzoniazid

LAM: Latin American and Mediterranean

MDR: Multi Drug Resistan

MgCl₂: Magnezyum klorür

MIRU-VNTR: Mycobacterial Interspersed Repetitive Units–Variable Numbers of Tandem Repeats

MOTT: Mycobacteria other than tubercle bacilli

SİMGELER VE KISALTMALAR

MPTR: Majör Polymorphic Tandem Repeats
NaCl: Sodyum klorür
NaOH: Sodyum hidroksit
NTM: Non Tüberküloz Mikobakteriler
NTP: Nükleotit tri fosfat
OT: Old Tüberkülin
PAS: Para Amino Salisilik Asit
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PGRS: Polymorphic G-C Rich Sequence
PNL: Polimorf Nüveli Lökosit
PPD: Pürfiye Protein Derivesi
PT: Paylaşılan Tip
PZA: Pyrazinamid
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF: Rifampisin
RNA: Ribo Nükleik Asit
RNaz: Ribonükleaz
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
SM: Streptomisin
SSPE: Sodyum Dodesil Sülfat EDTA
TBE: Tris Borik asit-EDTA
TE: Tris-EDTA
UV: Ultra Viyole

GİRİŞ

İlk insanla birlikte var olduğu düşünölen tüberküloz, tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere ve yaşam kalitesinin artmasına rağmen, dünyada ve ölkemizde insan sağlığını tehdit eden en önemli infeksiyon hastalıklarından biridir (1). Dünya nüfusunun yaklaşık 1/3 *Mycobacterium tuberculosis* ile infektidir. Her yıl bu hastalığa bağılı olarak yaklaşık 3 milyon kişi ölmektedir (2).

1980'li yıllarda çiçek hastalığı gibi dünyadan eradike edileceğı düşünölen tüberkülozun geri dönüşü, ilaçla tedavinin başladığı yıllara oranla daha dramatik olmuştur. Çoğul ilaç dirençli (ÇİD) suşlarla infekte vakaların artması, sekonder ilaçların ciddi yan etkilerinin oluşu ve yüksek maliyet, bu vakaların tedavisini zorlaştırmakta ve mortaliteyi artırmaktadır. Başlangıçta gelişmekte olan ölkeler için ciddi bir problem oluşturan tüberküloz, immünsüprese hasta popülasyonunun artması ve HIV epidemisine bağılı olarak gelişmiş ölkeleri de tehdit etmektedir (3,4).

İnfeksiyon havuzunun bu denli geniş olduğu dünyamızda, ölkemiz orta insidansa sahip ölkeler arasında yer almaktadır. İnsidans 100.000 de 26 , infeksiyon prevalansı da %25 olarak belirlenmiştir (5,6). Ölkemizde; tüberküloz vakalarının büyük bir kısmı genç popülasyonda görülürken, kadınlara göre erkeklerde 2.5 kat daha fazla infeksiyon gelişmekte ve akciğer tüberkülozunun daha yaygın olduğu belirtilmektedir (7,8).

Ulusal düzeyde ilaç direnci ile ilgili bir sörveyans çalışması yapılmamıştır. Ancak bölgesel olarak yapılan çalışmaların sonuçlarına baktığımızda başlangıç direnci % 1.3-4.8 , edinsel direnç ise % 4.4- 16.6 olarak bulunmuştur (6,7,9).

Tüberkülozun tanı ve tedavisinin başarılı bir şekilde yapılabilmesi, etkili koruma ve kontrol önlemlerinin alınmasına ve tüberkülozun epidemiyolojisinin anlaşılmasına bağılıdır. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin gelişmesi, klasik epidemiyolojik verilerin değerlendirilmesine büyük katkı sağlamıştır (9,10).

Mycobacterium tuberculosis'in moleküler tiplemesi için altın standart IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) metodudur (11-13). Bu yöntemin standardizasyonu tam olarak sağlanmış olmasına rağmen, uzun zaman alması, sekonder kültüre gereksinim duyulması, yüksek maliyet, RFLP profillerinin laboratuvarlar arası karşılaştırılmasının zorluğu ve düşük kopya sayılı suşların ayırımındaki yetersizlik, bu yöntemin global epidemiyolojik çalışmalarda kullanımını sınırlamıştır (14,15). Bu problem, ilk zamanlarda, polimeraz zincir reaksiyon (PZR) tabanlı, kullanımı kolay ve hızlı "spoligotipleme" yönteminin IS6110-RFLP ile birlikte kullanılmasıyla giderilmiştir (13,16).

Spoligotipleme ile özellikle düşük sayıda IS6110 kopyası bulunduran veya hiç IS6110 bölgesi bulunmayan *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının moleküler tiplemesi daha yüksek güvenilirlikte saptanabilmekte ve tüberküloz basillerinin filogenetik dağılımı hakkında bilgiler edinilebilmektedir (13-15). Herhangi bir toplumdaki tüberküloz izolatları arasında saptanan majör spoligotip familyaları diğer ülkelerdeki ile kıyaslanarak basilin dünya üzerindeki yayılım yolu hakkında bilgiler edinilebilmektedir (9).

Türkiye’de tüberkülozun moleküler epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalar daha çok IS6110 RFLP ve pTBN12 tiplendirme yöntemlerine dayalı olarak yapılmıştır (7,8). Bu çalışmalardan ilimiz ve Türkiye genelindeki *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarındaki klonal ilişki hakkında bir fikir sahibi olmaktayız. Ancak ülkemizdeki spoligotip profillerinin neler olduğu, bu profillerin ilaç direnciyle ilişkileri, çoğul ilaca dirençli izolatlar için özgü profil bulunup bulunmadığı, spoligotiplemenin IS6110 RFLP tiplemesinin özgüllüğüne katkısının ne oranda olduğu konularında yeterli veri bulunmamaktadır. Ayrıca IS6110 RFLP yöntemiyle farklı profil gösteren W/Beijing, *Mycobacterium bovis* , *Mycobacterium canettii* ve *Mycobacterium microti* gibi *Mycobacterium tuberculosis* kompleks içinde bulunan türler spoligotipleme ile özgül bir profil oluşturduklarından kolayca tanımlanabilmektedir (13,16-17).

Tezin amaçları;

- 1- *Mycobacterium tuberculosis* izolatları arasındaki majör spoligotip profillerinin belirlenmesi
- 2-Majör spoligotip familyalarının bölgeler arasındaki değişiminin incelenmesi
- 3-Majör spoligotip familyalarının ilaç direnciyle ilişkilerinin araştırılması
- 4-Çoğul ilaca dirençli izolatlar için özgü spoligotip profili bulunup bulunmadığının değerlendirilmesi
- 5- Spoligotiplemenin IS6110 RFLP yönteminin özgüllüğüne katkısının ne oranda olduğunun belirlenmesi
- 6-Ülkemizdeki *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının dünyadaki kökeni ve dağılım yolları hakkında hipotezler kurulması.

GENEL BİLGİLER

Tarihin en eski hastalıklarından biri olan tüberkülozun etkeni *Mycobacterium tuberculosis* 1882’de Robert Koch tarafından bulunmuştur. Geliştirdiği patolojik yapıya göre “tüberküloz basili”, bulan kişiye izafeten “Koch basili” ve boyanma özelliğine göre de ARB (aside dirençli bakteri) veya AARB (aside alkole dirençli bakteri) olarak adlandırılmıştır (18). Doğada, toprakta, sulara ve çevrede yaygın olarak bulunan mikobakterilerin ilk insan topluluklarının sığırları evcilleştirmeye başlamasıyla insanlara bulaştığı düşünülmektedir (19). Mikobakterilerin saprofit ve patojen olan 100’e yakın türü tanımlanmış ve bunlardan 14 tanesinin insanda hastalık yaptığı belirlenmiştir (20,21).

Mikobakterilerin sınıflandırılması (22,23).

Alem : Prokaryot

Bölüm: Firmicutes

Sınıf : Actinobacteria

Takım: Actinomycetales

Aile : Mycobacteriaceae

Cins : Mycobacterium

Tür : Mycobacterium tuberculosis

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri yönünden birbirleriyle yakından ilişkili olan türler kompleks başlığı altında gruplandırılmaktadır. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium ulcerans* ve *Mycobacterium bovis* BCG) ve *Mycobacterium avium* kompleks gibi (21). *Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışında kalan mikobakterilerin sınıflandırılması Runyon tarafından üreme hızı, koloni morfolojisi ve pigmentasyon esas alınarak yapılmıştır (21,22).

Runyon sınıflandırması:

Runyon grup 1 Fotokromojenler (karanlıkta renksiz ışıkta pigmentli)

Mycobacterium kansasii

Mycobacterium marinum

Mycobacterium simiae

Runyon grup 2 Skotokromojenler (karanlıkta ve ışıkta pigmentli)

Mycobacterium szulgae

Mycobacterium gordonae

Mycobacterium xenopi

Runyon grup 3 Non kromojenler (karanlıkta ve ışıktta pigmentsiz)

Mycobacterium intracellulare

Mycobacterium avium

Mycobacterium haemophilum

Runyon grup 4 Hızlı üreyenler (pigmentsiz olanlar)

Mycobacterium abscessus

Mycobacterium chelonae

Mycobacterium fortuitum

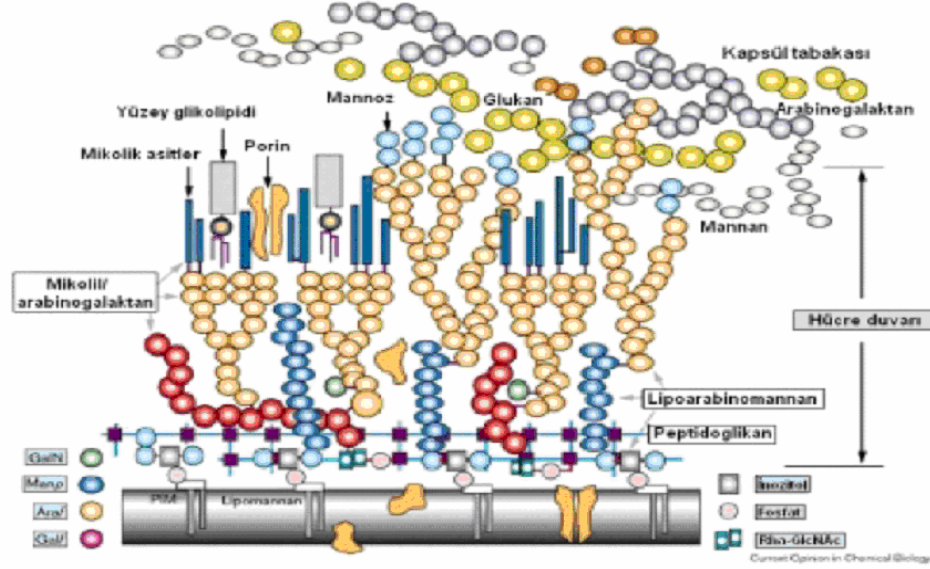
Mycobacterium tuberculosis kompleks dışında kalan mikobakteriler Atipik mikobakteriler (ATM), nontüberküloz mikobakteriler (NTM) ve tüberküloz basili dışındaki mikobakteriler (MOTT= Mycobacteria other than tubercle bacilli) olarak isimlendirilmiştir (21,22).

Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Mikobakteriler 0.2-0.6 µm eninde 1-10 µm boyutlarında hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, hücre içi yerleşim gösteren aerop basillerdir. Tek tek küçük zincirler veya demetler halinde bulunabildiği gibi klinik örneklerde X, V, L harfleri oluşturacak biçimde de bulunurlar DNA'daki G+C oranı diğer bakterilere oranla yüksektir (%62-70) (20-22). Hücre duvar yapıları diğer bakterilerden oldukça farklıdır. Hücre duvar yapısının ana iskeletini peptidoglikan ve arabinogalaktan molekülleri oluşturur. Ayrıca arabinogalaktan ve glikolipidler arasında yer alan uzun zincirli doymuş yağ asitlerinden olan mikolik asit hücre duvarının önemli yapılarındandır. Hücre duvarının kalınlığı ve yüksek lipid oranı mikobakterilere boyanma sırasında aside direnç, konak hücre tarafından salınan litik enzimlere, fagositoza ve bakterisidal ilaçlara direnç gibi temel özelliklerinin oluşmasına yol açmaktadır (21,22).

Mikobakterilerin hücre duvarı üç tabakadan oluşmuştur. Plazma zarının üzerinde bulunan en iç tabaka peptidoglikandır (mürein). Bu tabaka kısa peptid zincirleri, çapraz bağlarla sıkıca bağlanan uzun polisakkarit zincirleri içerir ve hücrenin sert yapısını sağlar. Peptidoglikan tabakasının üzerinde bulunan ikinci tabaka arabinogalaktan tabakası olup hücre duvarı kitlesinin %35'ini yapar ve peptidoglikan tabakasına fosfodiester köprüleriyle bağlıdır Şekil 1. Arabinogalaktanların yan zincirindeki uç arabinaz birimlerine mikolik asitler kovalent olarak bağlanırlar. Bu asitler hücre duvarı kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Mikolik asitler, trehaloz dimikolata bağlanarak kord faktörü oluştururlar. En dış tabaka ise bir grup heterojen peptidoglikolipidler veya fenolik

glikolipidden oluşmuştur ve mikozidler olarak adlandırılırlar. Hücre duvarında bulunan ve duvar ağırlığının %60'ını yapan lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu lipidler tüberkülostearik asit, mikoserik asit ve mikolik asitleri içerirler (3,22,23).



Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı (Özerol İ.H. 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, 2003, Sayfa: 1-6).

Mikobakterilerin lipid, protein ve polisakkaritlerden oluşan antijenleri vardır:

Old tüberkülin (OT) : Robert Koch tarafından bulunan ve tüberkülin deri testinde kullanılan ısıya dayanıklı bir proteindir.

Pürifiye protein deriveleri (PPD) : OT'nin pürifikasyonu ile elde edilen ve DSÖ tarafından tüberkülin deri testinde kullanılması kabul edilen test maddesidir.

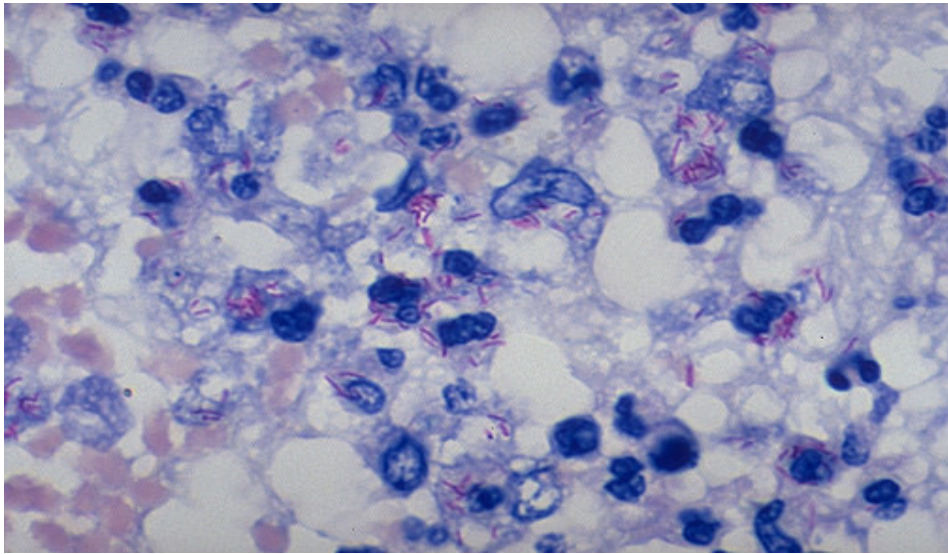
Trehaloz dimikolat (Kord faktör): Bakterinin virulansı ile ilgilidir. Kültürden hazırlanan preparatlarda bakterinin demetler halinde bir arada bulunmasından sorumlu olduğu gibi PNL migrasyonunu önleme ve granülom oluşumunu stimüle etme gibi fonksiyonlara da sahiptir.

Sulfolipidler (trehaloz-2- sülfat): Bakterinin hücre içinde canlı kalmasından ve kord faktörle sinerji oluşturmasından sorumludur.

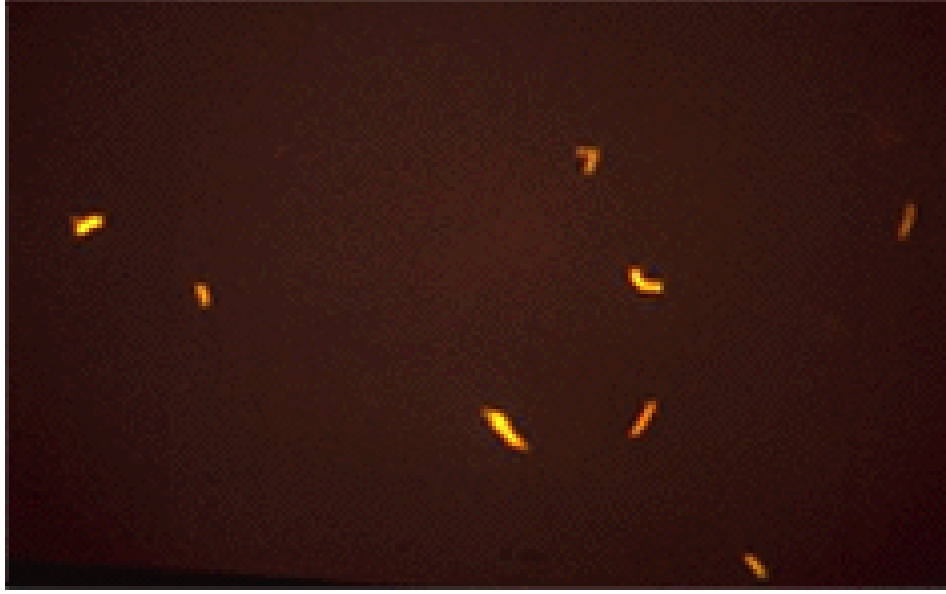
Isı şok proteinleri (65Kda, 38 Kda, 12 Kda): Koruyucu immünite gelişmesinde ve komplikasyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir (20,22).

Mikobakterilerin Üreme Özellikleri: Zorunlu aerob bakterilerdir, ortamda %5-10 CO₂ varlığında daha iyi ürerler. Optimal üreme ısıları 35-37°C dir, ancak 24-42°C arasında üreyebilmektedirler. Mikobakterileri üretmek için yumurta ve patates bazlı semi sentetik katı (Löwenstein-Jensen ve Petragani), ayrıca vitamin, katalaz enzimi, oleik asit gibi zenginleştirici maddeler içeren katı-sıvı besiyerleri (Middlebrook 7H9-12) mevcuttur. Mikobakterileri diğer bakterilerden ayıran en önemli özellik bölünme sürelerinin 18-20 saat olmasıdır, bu nedenle katı besiyerinde gözle görülür koloni oluşturmaları 15-20 günü bulmaktadır (22). Son zamanlarda otomatize sistemlerde (BACTEC TB 460, MGIT 960, MB/BacT Alert, Myco-ESPII ve MYCOLOR TK) katı-sıvı besiyerleri kullanılarak bu süre on güne kadar inmiştir (24).

Boyama ve Mikroskopik İnceleme: Hücre duvar yapısının özelliğinden dolayı rutin mikrobiyolojik boyalarla boyanmazlar. Mikobakteriler için en yaygın kullanılan boyama tekniği Ehrlich-Ziehl-Neelsen yöntemidir. Preparatlar alttan ısıtılarak pembe-kırmızı renkte olan karbol fuksinin hücrenin içine girmesi sağlanır. Asit alkole dirençli olan bu bakteriler dekolare olmadıklarından zıt boya metilen mavisi ile boyandıklarında 100'lük objektif de mavi zeminde pembe kırmızı basiller olarak görünürler (Şekil 2). Diğer bir boyama yöntemi olan Kinyoun 'da ise on kat daha yoğun hazırlanmış karbol fuksin ile preparatlar uzun süreli ve ısıtılmadan boyanmaktadır (25). Mikobakterilerin tanısında florokrom boyalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Auramin ile boyanan preparatlar floresan mikroskopta 25 veya 40'lık objektif de bakıldığında siyah zeminde portakal sarısı renkte görünürler (26) (Şekil 3).



Şekil 2. Ziehl-Neelsen boyama ile mikobakterilerin görünümü (<http://bepast.org./dataman.mycobacterium tuberculosis.jpg>).



Şekil 3. Auramine boyama ile floresan mikroskopta mikobakterilerin görünümü (www2.provlab.ab.ca/bugs/mycob/afb_stain/fl_ar.htm).

Çevresel Faktörlere Direnç Durumu: *Mycobacterium tuberculosis* kuruluğa oldukça dayanıklıdır, güneş görmeyen ortamda kuru balgamda 6-8 ay , katı besiyerinde 12 yıl canlı ve virulan olarak kalabilmektedir. Ancak, ısıya duyarlıdır; 60°C de 20 dakika, 70°C de 10 dakikada ölmektedirler. Çamaşır suyu, povidon-iyot, %5 fenol bileşiklerine ve UV ışınlarına karşı duyarlıdır (3,20,22).

Patogenez ve Patoloji: *Mycobacterium tuberculosis*'in salgıladığı bir toksini ve virülansını belirleyen bir özelliği yoktur. Tüberküloz, infeksiyon oluşumu ve bundan sonraki dönemde hastalık gelişimi olmak üzere iki aşamalı bir sürece sahiptir. İlk infeksiyon inhalasyon ile oluşur. *Mycobacterium tuberculosis* mukusu geçemediğinden enfeksiyon oluşumu için mutlaka alveoler alana ulaşmalıdır. Buraya da ancak 1-10 µm'lik damlacık çekirdekleri ulaşabilir. İnsanda minimal infekte edici basil sayısı 10, tavşan ve kobaylarda ise 1-3 kadardır (3,21,22). İn hale edilen bakterinin hastalık oluşturması hem basilin virülansına hem de alveolar makrofajın öldürme kapasitesine bağlıdır. Eğer bakteri bu aşamada yok edilmezse histolojik olarak iki tip reaksiyon oluşur. Eksüdatif lezyon; bakterinin girdiği bölgede çoğalması sonucu PNL (polimorf nüveli lokosit)'lerin rol oynadığı akut ve subakut enflamasyondur. Granülomatöz (prodüktif) lezyon ise; konağın tüberkülo proteine hipersensitivite geliştirmesi ile olur. Bakteri ile karşılaşan makrofajlar epitelooid hücreler haline dönerek hastalığın karakteristik yapısı olan tüberküleri oluştururlar. Tüberkülin ortasında dev hücreler çevresinde ise lenfosit ve fibroblastlar yer

alır. Bir süre sonra tüberkülin orta kısmı nekroze olur (kazefikasyon nekrozu). Bu geç tip aşırı duyarlılığa bağlıdır. Bulaştan 2-8 hafta sonra meydana gelir. Eğer konağın cevabı güçlü olursa lezyon fibrozis ve kalsifikasyonla sonlanır. Bu bölge ve bölgesel lenf nodülü primer kompleks-Ghon kompleksi adını alır. Eğer konağın immun yanıtı yeterli değilse hastalık ilerler ve primer tüberküloz meydana gelir. Bazen dışarıdan tekrar basil alınması veya hastalığın reaktivasyonu ile sekonder veya reenfeksiyon tüberküloz meydana gelir (3,22).

Bulaşıcı nitelikteki bir akciğer tüberkülozlu hasta ile (yayma pozitif) karşılaşan tüberkülin deri testi negatif temaslıların yaklaşık %30'unda tüberküloz enfeksiyonu oluşur ve bu kişilerde gerek klinik gerekse radyolojik hiç bir belirti olmaksızın tüberkülin deri testi pozitifleşir. İnfekte olan bu kişilerin %5'inde enfeksiyonu izleyen 5 yıl içinde hastalık gelişir (primer tüberküloz). Primer enfeksiyonu izleyen uzun bir latent dönemden sonra (en az 5 yıl sonra) infekte kişilerin %5'inde hastalık gelişmektedir (sekonder tüberküloz). Tüberkülozda, canlı bir tüberküloz basilinin alveole yerleşmesinden kaviter akciğer tüberkülozu gelişimine kadar geçen olaylar, basil ile konakçı arasındaki bir seri "savaş" sonucu olur. Konakçı tarafından oluşturulan hücre aracılıklı immünite ve geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonları tüberküloz patogenezinde belirleyici rolü oynarlar. Bu immün yanıtlar oluşuncaya kadar tüberküloz basilinin kendisi konakçı dokularında hiç bir hasar oluşturamaz. Basil çoğalması ile konağın oluşturduğu immünolojik yanıtlar arasındaki etkileşim hastalığın hem ilerlemesini veya gerilemesini hem de gelişecek olan hastalığın tipini belirler (3,21).

Hastalığa duyarlılıkta ırklar arasındaki farklılık ve genetik yapı önemli rol oynamaktadır. Örneğin kızılderililerin, eskimoların ve zencilerin bu hastalığa daha yatkın oldukları belirlenmiştir. Ayrıca HLA BW15 taşıyan zenciler ile HLA DR2 taşıyan kızılderililerin daha duyarlı oldukları tespit edilmiş (20). Yaş, cinsiyet, sosyo ekonomik durum, sigara kullanımı, alkolizm, uyuşturucu madde bağımlılığı, kalabalık yaşantı, diyabet, HIV ve evsizlik hastalığın gelişimi için risk faktörleri arasındadır (6,27,28).

Tüberkülozun başlıca klinik formları şunlardır:

Akciğer tüberkülozu: Tüberkülozun en sık rastlanan formudur. Hastalık insandan insana yakın temas ile enfekte aerosollerin (damlacık çekirdeği) alınması ile bulaşır. Tüberkülozun ortaya çıkabilmesi için basilin akciğerlere ulaşması gerekmektedir, konağın enfeksiyona verdiği yanıtı bağlı olarak doku hasarı ve fibrozis ile karakterizedir. Akciğere ulaşan bakteri alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilirler konağın cevabı bu aşamada

güçlü olursa bakteriler temizlenir. Eğer basil miktarı fazla ve immün sistem zayıf ise bakteri üremesine devam ederek primer odak oluşturur. Bu genelde sub plevral yerleşimlidir ve alt-orta loblarda bulunur. İki haftadan uzun süren öksürük, göğüs ağrısı, nefes darlığı ve ses kısıklığı ile başlar ve halsizlik, çabuk yorulma iştahsızlık, kilo kaybı, ateş ve gece terlemesi gibi klinik bulgularla devam eder. Tanıda fiziki muayene yardımcı değildir ancak altta yatan nedenlerin belirlenmesi için zorunludur. Akciğer grafisi ve PPD pozitifliği kıymetlidir ancak kesin tanı bakteriyolojiktir. Balgam, bronşial lavaj ve açlık mide suyu gibi örneklerin mikroskopi, kültür ve nükleik asit çoğaltma yöntemleriyle incelenmesi ile tanı konulabilmektedir (3,5,21,29).

Miliyer tüberküloz: Tüberküloz basillerinin bir odaktan hematojen yolla tüm vücuda yayılması ve çeşitli organ ve dokularda granülom geliştirmesidir. Ölüm oranı oldukça yüksektir. Başta çocuklar olmak üzere, immünsüprese hastalarda ve kronikleşmiş altta yatan hastalığı olan erişkinlerde sık görülür. Genellikle kazeöz lezyonun pulmoner vene rüptüre olması ile ortaya çıkar. Tüberkülin testi negatiftir. Tanıda karaciğer, kemikiliği biyopsileri ve akciğer grafisi önemlidir. Genelde tanı post mortaldir (22,29).

Tüberküloz lenfadenit: Akciğer dışı tüberküloz içinde en sık rastlanan formudur. Hastalık primer pulmoner odaktan hematojen yayılan tüberküloz basilleriyle meydana gelmektedir. En sık tutulan lenf nodları anterior servikal ve supraklaviküler lenf nodlarıdır (29).

Plevra tüberkülozu: Akciğer dışı tüberkülozların en sık rastlanan ikinci klinik şeklidir. Yaşlılarda ve erişkinlerde eksüdatif plörezinin en önemli nedenidir. Plevral boşlukta toplanan sıvı membranın spesifik allerjik reaksiyonu sonucu ortaya çıkar. Tanıda sıvının incelenmesi yararlıdır ancak granülomlardan alınan biyopsi örneklerinden etken daha sık izole edilmektedir (20-22).

Kemik ve Eklem Tüberkülozu: Hematojen yayılım sonrası ortaya çıkar. Kemik tüberkülozunun %50 sini oluşturan “Pott hastalığı” yani tüberküloz spondilit sıklıkla torakal bölgeyi daha sonra da lomber, servikal ve sakral bölgeyi tutar. Klinikte soğuk abse olarak bilinen tipik bir tablo oluşturur. En önemli komplikasyonu paraplejidir. Tanıda effüzyon materyalinde ve biyopsi materyalinde basilin ARB boyama ile gösterilmesi ve kültürü, direkt iskelet sistemi grafileri kıymetlidir (21-22,29).

Böbrek Tüberkülozu: Basilin uzak bir odaktan hematojen yayılımı ile oluşmaktadır. Genellikle her iki böbrek de infektidir. Fakat yalnız birinde hastalığın ilerlediği kabul

edilmektedir. Hastalık basilin, bağımsızlık sisteminin etkili olamadığı hipertonic bir ortam olan kortikal medullaya yerleşmesiyle başlar. Sinsi seyrederek, çoğu zaman da asemptomatiktir. İdrar kültürlerinde üreme olmaması, hematüri ve proteinüri vardır. Üç gün ard arda yoğunlaştırılmış idrarın ARB, kültür ve PZR yöntemleriyle incelenmesi ile tanı konulabilir. Ancak saprofit mikobakteriler tanıda problem oluşturmaktadır (22,29).

Barsak Tüberkülozu: Burada en sık izole edilen etken *Mycobacterium bovis*' dir. Pastörize edilmemiş sütlerin içilmesi ile bulaşır. Akciğer ve larinks odağı olan hastalarda hematojen yayılımla ve enfekte balgamın yutulması ile enfeksiyon gelişir. Tanıda gaitanın incelenmesi ve kolonoskopi değerlidir (21).

Tüberküloz menenjit: Tüberkülozun en ağır klinik formudur. Her yaşta görülebilirse de özellikle 5 yaş altında siktir. Primer enfeksiyonun erken veya geç komplikasyonu olarak gelişir. Çoğu olgunun kendisinde ya da ailesinde tüberküloz öyküsü vardır. Deri testi negatiftir. BOS basıncı artmıştır, hücre sayısı 500 altında ve lenfosit hakimiyeti vardır. Mikroskopik inceleme, kültür ve PZR tanıya yardımcı olabilmektedir (20-22,29).

Tüberküloz ve HIV Enfeksiyonu: HIV ile enfekte kişilerde CD4 T lenfosit fonksiyonlarının bozulması tüberküloz basilinin bağımsızlık sisteminden kaçmasına neden olur. Normal kişilerde tüberküloz basili ile karşılaşıldıktan sonra enfeksiyon gelişme riski %10 iken HIV pozitif hastalarda bu oran bir yıl içinde %10 dur. Tüberküloz diğer fırsatçı enfeksiyonlardan daha erken ortaya çıkar, akciğer dışı bölgelere yayılımı ve mortalite oranı yüksektir (22).

Tedavi

Günümüzde tedavi edilebilir hastalıklar arasında yer alan tüberkülozla etkin tedavi, 1950 yılından itibaren başlamıştır. Tedavide amaç; hastalığı kısa sürede iyileştirmek, temashıları ve toplumu korumak, kazanılmış ilaç direncini önlemek, akciğer hasarına ve komplikasyonlara bağlı ölümleri önlemektir (3,29).

Tedavide kullanılan ilaçlar; kullanım önceliğine göre birinci seçenek ilaçlar (majör); İsoniazid (INH), Rifampisin (RIF), Etambutol (ETB) ve Pyrazinamid (PZA). İkinci seçenek ilaçlar (minör); Streptomisin (SM), Sikloserin, Etionamid, Tiasetazon, Amikasin, Kanamisin, Kapreomisin, Para-amino salisilik asit (PAS), Rifabutin ve Florokinolonlardır. İkinci seçenek ilaçlar birinci seçenek ilaçlara göre daha az etkili ve yan etkileri daha fazladır. Akciğer tüberkülozlu olgularda üç farklı mikobakteri popülasyonu bulunduğundan (açık lezyonda ekstrasellüler yerleşmiş olanlar, makrofaj içinde asidik

ortamda bulunan intrasellüler basiller ve kazeöz lezyon içinde bulunanlar) bu üç gruba da etkili kombine ilaç kullanımını gerektirmektedir. Streptomisin açık lezyonda bulunan ve hızlı üreyen gruba etkilidir. Pirazinamid asidik ortamda etkili olması nedeniyle makrofajlar içindeki gruba etkili olurken İzoniazid ve Rifampisin tüm popülasyona etkilidir. Bu nedenle tüberkülozun tedavisinde ana iskeleti oluşturmaktadır. Her iki ilaca birlikte direnç “çoğul direnç” (ÇİD) olarak tanımlanmaktadır (3,21). Bu tip olgular ikinci seçenek ilaçlarla hastane ortamında ve uzun süreli tedavi edilir. Dünya Sağlık Örgütü son yıllarda tüberküloz tanısı konulan her hastanın direkt gözlem altında tedavi (DGT) programına alınmasını önermektedir (3,21,30).

Tüberkülozdan Korunma

Aşı, canlı avirulan *M. bovis* BCG suşundan elde edilir. PPD negatif kişilere uygulanır. Bugün BCG aşısının tüberküloz menenjitte ve dissemine tüberküloza karşı koruma sağladığı, fakat akciğer tüberkülozundan korumadığı bilinmektedir. Gelişmiş ülkelerde tüberküloz infeksiyon riskinin az olması, BCG'nin verdiği immünitinin PPD'nin tanıdaki değerini azaltması ve koruyuculuğunun değişken olması nedeniyle tüm toplumun aşılama politikasından vazgeçilmiştir. Ülkemizde ise doğumdan hemen sonra ve okul çağında olmak üzere iki kez BCG aşısı uygulanmaktadır (3,21,31).

Epidemiyoloji

Tüberküloz tarihte olduğu gibi günümüzde de halk sağlığını tehdit eden en önemli hastalıklardan biridir ve tüm dünyada önlenemez ölümlerin en önemli sebepleri arasında yer almaktadır (23). 1946'da streptomisin, 1966'da rifampisin bulunmasıyla ilaçla tedavide büyük başarılar elde edilmiş ve uygulanan aşılama, tanı ve tedavi stratejileriyle 1980'li yıllara gelindiğinde özellikle gelişmiş ülkelerde büyük başarılar elde edilmiştir. Ancak elde edilen bu başarının ardından hükümetlerin ilgilerinin azalması, bütçeden yeterli kaynak aktarılmaması, ilaçlara direnç gelişimi, hastalığın sorun olduğu bölgelerden göçler ve HIV epidemisine bağlı olarak tüberküloz geri dönmüştür (6).

Tüberkülozdan korunma ve etkin kontrol önlemlerinin geliştirilmesinde hastalar arasındaki yayılmanın derecesini ve kaynağın bilinmesi çok önemlidir. Bunun için kökenler arasındaki benzerliğin araştırılması gereklidir. Mikobakterilerin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerinden yararlanılarak cins ve tür düzeyinde tanımlamaları yapılabilmektedir. Tür düzeyinde tanımlama tüberkülozun etiyolojisini aydınlatma bakımından yeterli olabilmektedir. Ancak, salgınlar esnasında izole edilen aynı tür içindeki

birçok suşun birbiriyle klonal ilişkisinin olup olmadığını belirlemek için tür içinde farklılık gösterebilen varyantların saptanması yani alt tiplene yapılması gerekmektedir (28).

Bir toplumdaki tüberküloz sorununun boyutlarını kavramak, zaman içindeki seyrini izlemek ve alınan kontrol önlemlerinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla değişik epidemiyolojik ölçütler kullanılmaktadır.

Tüberküloz epidemiyolojisinde kullanılan kavramlar :

Tüberküloz infeksiyonu: Basilin bulaşıp, lokal granülomatoz bir inflamasyona neden olması ve basillerin sistemik olarak kontrol altına alınmasıdır (6,29,32).

Aktif tüberküloz olgusu: Balgam ve diğer klinik örneklerle basil çıkaran olgu (6).

Tüberküloz infeksiyon prevalansı: Belli bir toplumda bir yıllık sürede infekte bulunan kişilerin (BCG ile aşılanmamış kişiler arasında PPD'si pozitif olanların) oranı. Bir ülkede infekte insan havuzunu bilmek açısından önemli bir epidemiyolojik göstergedir (6,29,32).

Tüberküloz infeksiyon riski (yıllık infeksiyon riski): Bir yıl içinde tüberküloz basili ile ilk defa infekte olacakların oranı. Yani belli bir toplumda tüberküloz basili ile infekte olmamış ve BCG aşısı yaptırmamış, tüberkülin deri testi negatif olan kişilerin bir yıl içinde infekte olma ihtimalidir. Bir ülkedeki tüberküloz bulaşıcılığını yansıtan önemli bir epidemiyolojik ölçüttür. PPD pozitifliği takip edilerek hesaplanır. Azalma %10 ve üzerinde ise tüberküloz kontrol önlemleri başarılı, %5 den az ise başarısız olarak değerlendirilir (6,32).

Tüberküloz prevalansı (nokta prevalansı): Belli bir toplumda araştırmanın yapıldığı anda, 100 bin kişilik nüfusta bulunan tüberkülozlu hasta (eski + yeni olgu) sayısını gösterir (4,5).

Tüberküloz insidansı: Bir yıl içinde 100 bin kişilik nüfusta saptanan yeni hasta sayısıdır. DSÖ tüberküloz insidansı 25/100.000'den az olan ülkeleri düşük, 25-100/100.000 olanları orta ve 100/100.000'den fazla olanları hastalık insidansı açısından yüksek ülkeler olarak kabul etmektedir (6,32). Tüm dünyada bulunan tüberküloz hastalarının %80'i 22 ülkede bulunmaktadır. Bunlardan en çok hastanın bulunduğu beş ülke Hindistan, Çin, Bangladeş, Filipinler ve Güney Afrika'dır. Tüberküloz hastalığına bağlı ölümler tüm dünyadaki ölümlerin %7'sini, az gelişmiş ülkelerde ise %26'sını oluşturmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerdeki diğer bir problemde gerçek tüberküloz

hastalarının ancak %46'sının saptanabildiği ve bunlarında yarısının tedavi edilebildiği gerçeğidir (5,6).

HIV enfeksiyonu ABD gibi gelişmiş ülkelerde tüberkülozun daha genç hastalarda rastlanması, reaktivasyona göre primer tüberküloz olgularının artması ve çok ilaca dirençli tüberküloz sayısında artış gibi tüberküloz epidemiyolojisinde önemli değişimlere neden olmuştur. Amerika ve Afrika'dan sonra Güney Doğu Asya ve Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde de bu iki hastalığın birlikteliği artış göstermiştir (5,28).

Tüberkülozun tekrar dünyanın gündemine girmesinde etkili olan en önemli faktör çoğul ilaca dirençli suşların oranındaki artıştır. Çin'in Beijing bölgesinden orjin aldığı ve daha sonra tüm dünyaya yayıldığı tahmin edilen W genotipinin çoğul ilaç direncine sahip olduğunun belirlenmesi epidemiyolojik çalışmaların bu yöne kaymasına neden olmuştur (33).

Ülkemizde sağlık hizmetlerinin farklı kurumlar üzerinden sağlanması ve kayıt ihbar sisteminin yeterince işlemeyişi nedeniyle tüberkülozun epidemiyolojisi ile ilgili yeterli, güvenilir ve güncel veri bulunmamaktadır. BCG aşısını rutin uygulamamızdan dolayı enfeksiyon riski hesaplamaları yapılamamakta ve dispanserlere kayıtlı hastalar dışındaki hastaların sayıları ve özellikleri sağlıklı şekilde bilinmemektedir (5,6). Ülkemizde yapılan bir çok çalışmanın sonuçlarına göre; tüberküloz hastalarının çoğunluğunun genç yaşta olduğu, kadınlara göre erkeklerde 2.5 kat daha sıklıkta görüldüğü, akciğer tüberkülozunun daha yaygın olduğunu söyleyebiliriz (9). Ulusal direnç durumunu yansıtan veri bulunmamakla birlikte farklı illerden yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde ÇİD suşlarında başlangıç ve kazanılmış direnç oranı %1.3-4.8 ve % 4.4- 16.6 arasında değişmekte, en az bir ilaca karşı primer ve sekonder direnç oranları ise sırasıyla % 18-26.6 ve % 28- 53.4 arasında görülmektedir (6-8).

Yüksek insidansın yanında primer ilaç direncinin de artmış olması ülkemizde bulaş oranının yüksekliğini ve tüberküloz kontrol önlemlerinin yetersizliğine işaret etmektedir. Tüberküloz insidansını gelişmiş ülkelerdeki seviyeye düşürmede erken tanı, doğru tedavi ve etkin korunma-kontrol önlemlerinin alınması kaçınılmazdır (9).

Tüberkülozun epidemiyolojisinin belirlenmesinde kullanılan yöntemleri fenotiplendirme ve genotiplendirme olmak üzere iki ana başlık altında inceleyebiliriz (34).

Fenotiplendirme Yöntemleri:

Yirminci yüzyılın ortalarına kadar bugün bilinen patojen olan bakterilerin çoğu

tanımlanmış ve identifikasyonunda temel olacak fenotipik özellikleri belirlenmiştir. 1980'li yıllara kadar epidemi oluşturan suşlar cins, tür, biotip, serotip, faj tipi, bakteriyosin tipi ve antibiyotik duyarlılık profillerine dayanan fenotipik yöntemlerle incelenmiştir. Belirli bir fenotipik özellik bir suшта ender olarak bulunuyorsa bu özellik sayesinde suşun bulaş yolu hakkında fikir sahibi olabiliriz. Ancak her zaman görülen fenotipik özelliklere sahip suşlarda alt tiplendirme yöntemlerine ihtiyaç vardır (34).

Genel olarak kullanılan fenotipik yöntemler:

Antibiyotik duyarlılık profili,

Ağır metaller ve kimyasal maddelere duyarlılıkları,

Biyotipleme,

Bakteriyofaj tipi,

Bakteriyosin tipi,

Serotipleme,

Protein elektroforezi

Tüberküloz basillerinin ortak biyokimyasal özellik ve duyarlılık profili göstermesi ve mikobakterilerin sınırlı sayıda (8 adet) fajının olması, bazı fenotipik özelliklerinin her zaman eksprese olmayan genler üzerinde kodlanması nedeniyle duyarlılığının düşük olması bu yöntemlerin en büyük dezavantajı olmuş ve kullanımını sınırlamıştır (35,36). Bu sorunları aşacak ve klasik epidemiyolojik verilere ekstra katkı sağlayacak , ayırt ediciliği yüksek, uygulaması kolay, tekrarlanabilir ve çok merkezli çalışmalara uygun moleküler yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Böylece tüberkülozda moleküler epidemiyolojiden de söz etmek mümkün olmuştur.

Moleküler epidemiyoloji genel epidemiyolojiye dayanır, farklı olarak hastalığın gelişiminde etkili olabilecek spesifik yollar, genler ve molekülleri tanımlayarak hastalığın patogenezinin anlaşılmasına katkı sağlamaktadır (37).

Moleküler epidemiyoloji; infeksiyon hastalıklarının tanısı, etkenin biyokimyasal ve moleküler seviyede tanımlanması ve tiplendirilmesi, patogenezden sorumlu genlerin saptanması, genetik duyarlılığın belirlenmesi, konak-patojen ilişkisi, virulans ve bulaşıcılık yönünden farklılık gösterebilen spesifik suşların araştırılması, toplumlar ve akraba grupları arasında hastalığın yayılması, kontrolü ve etiyolojisine, moleküler seviyede katkıda

bulunur. Aynı zamanda potansiyel genetik ve çevresel risk faktörlerinin katkısı; enfeksiyon hastalıklarının aile içi ve toplumlar arasında yayılmasının önlenmesi üzerinde çalışma yapan ; klinisyen, epidemiyolog, çevre sağlığı uzmanı, biyoistatikçi, insan genetikçisi, moleküler mikrobiyolog ve bilgisayar mühendisi gibi bir çok bilim adamının birlikte çalışmasını gerektiren bir bilim dalıdır (35-37).

Moleküler tipleme yöntemlerinin geliştirilmesiyle enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu yöntemlerle tür içinde değişken ancak suşlarda stabil olan belirli bir genetik gösterge kullanılarak salgın esnasında toplanan, epidemiyolojik olarak ilişkili, aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılabilmektedir.

Moleküler tiplendirme başlıca şu amaçlar için kullanılmaktadır;

Salgın araştırılmasında,

Hastaların epidemiyolojik olarak ilişkilerinin belirlenmesinde,

Re- aktivasyonun re- enfeksiyondan ayırt edilmesinde,

Antibiyotik tedavisinin etkinliğinin belirlenmesinde ,

Hastane ve toplumsal kaynaklı enfeksiyonların ayrımında,

Laboratuvar içi bulaşın tespitinde,

Antibiyotik direncinden sorumlu genler hedef alınarak yapılan tipleme ile dirençli suşların tanımı ve yaygınlıklarının belirlenmesinde (37,39,40).

Moleküler tekniklerin gelişmesiyle, *Mycobacterium tuberculosis*'in filogenetik özellikleri ve yayılma dinamikleri daha iyi anlaşılabilir hale gelmiştir. Moleküler tipleme ile tüberkülozun rekürensisi, 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 yapılabilmekte, immün sistemi tam veya yetersiz hastalardaki ekzojen kaynaklı süper enfeksiyonlar belirlenebilmektedir. Rölapsli hastalarda farklı suşlarla enfeksiyon olduğu, ayrı tip suş çiftlerinin gösterilmesiyle ortaya konulmaktadır (36).

Moleküler tipleme yöntemleriyle çoğul ilaca dirençli ÇİD suşlarının kaynak ve yayılma yolları gösterilebilmektedir. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesi, bir toplum

ya da aile içindeki infeksiyonun orjini, yayılması ve direnç kazanmış olan suşların erken saptanması gibi önemli epidemiyolojik soruların yanıtını verebilir. Tipleme metotları, 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 (36,41). Moleküler epidemiyoloji, daha virülen kabul edilen izolatların toplumdaki dağılımlarının izlenmesine yardımcı olmaktadır.

Bir tipleme 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 grup (cluster) 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 (36).

Tipleme yöntemlerinin yaygın kullanım alanı bulabilmesi için belirli kriterlere sahip olmaları gerekmektedir (40).

Tiplendirebilirlik: Kullanılan yöntemin, bir tür içindeki tüm mikroorganizmaları tiplendirebilme yeteneğidir.

Ayrım gücü: Tipleme yönteminin bir türün farklı suşları arasında etkin ayırım yapabilme özelliğidir.

Tekrarlanabilirlik: Belirli bir suş ile yapılan tekraralarda aynı sonucun alınabilmesidir.

Stabilite: Aynı klondan gelen izolatların zaman içinde hep aynı tipi gösterebilme olasılığıdır.

Tekniğin kullanım kolaylığı, fiyatı, sonuç verme süresi ve sonuçlarının kolayca yorumlanabilir olması: Tipleme yöntemi basit ve ekonomik olmalıdır. Yöntemin kolay uygulanabilirliği ile klinik laboratuvarlarda yaygın kullanımı arasında ilişki vardır. Teknik olarak kompleks olan metotlar, rutin uygulamalardan ziyade referans laboratuvarlarında kullanılmaktadırlar.

Bu kriterlerin tamamını karşılayacak tek bir yöntem olmadığı için bu yöntemleri birlikte kullanmak gerekli bir kural gibidir . Tek merkezi ilgilendiren kısa süreli bir salgından izole edilen suşların ayırımı yapılacak ise, bir tipleme yöntemi yeterli olmaktadır. Ancak, ülke genelinde yapılacak olan kapsamlı epidemiyolojik çalışmalarda birkaç tipleme yönteminin birlikte kullanılması gerekmektedir (40).

Genotiplendirme Yöntemleri

Mycobacterium tuberculosis genomunun bütün baz dizilimi çıkarılmıştır. Genom yaklaşık 4.4 mega baz çiftinden oluşmaktadır ve oldukça yüksek oranda guanin-sitozin (%62-70) içermektedir (23,36). 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 (36). Bu nedenle mikobakteri DNA'sını direkt restriksiyon enzimi ile kesimi, özgül bir bölgenin restriksiyon enzimi ile kesimi, genom üzerinde bulunan tekrarlayan bölgeleri ya da bunların arasındaki boşlukların polimorfizmini hedefleyen yöntemler geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (38).

Başlıca tiplendirme metodları:

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

IS6110 RFLP

PGRS-RFLP

Spoligotiplendirme

MIRU- VNTR

16S ve 23S rRNA

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE): Bir çok bakteri için salgınların araştırılmasında ve popülasyon bazlı çalışmalarda kullanılan moleküler tiplendirmede “altın standart” kabul edilen bu yöntemde genomik DNA düşük ısıyla agaroz jel içinde ekstrakte edilerek çeşitli restriksiyon enzimleriyle (*EcoRI*, *AseI*, *DraI*, *SpeI* ve *XbaI*) 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 restriksiyon enzim paternleri belirlenir. Sınırlı sayıda bant oluşturması ve buna bağlı olarak ayırım gücünün yetersiz olması *Mycobacterium tuberculosis*'in epidemiyolojik çalışmalarında kullanımını kısıtlamıştır (36,42,43).

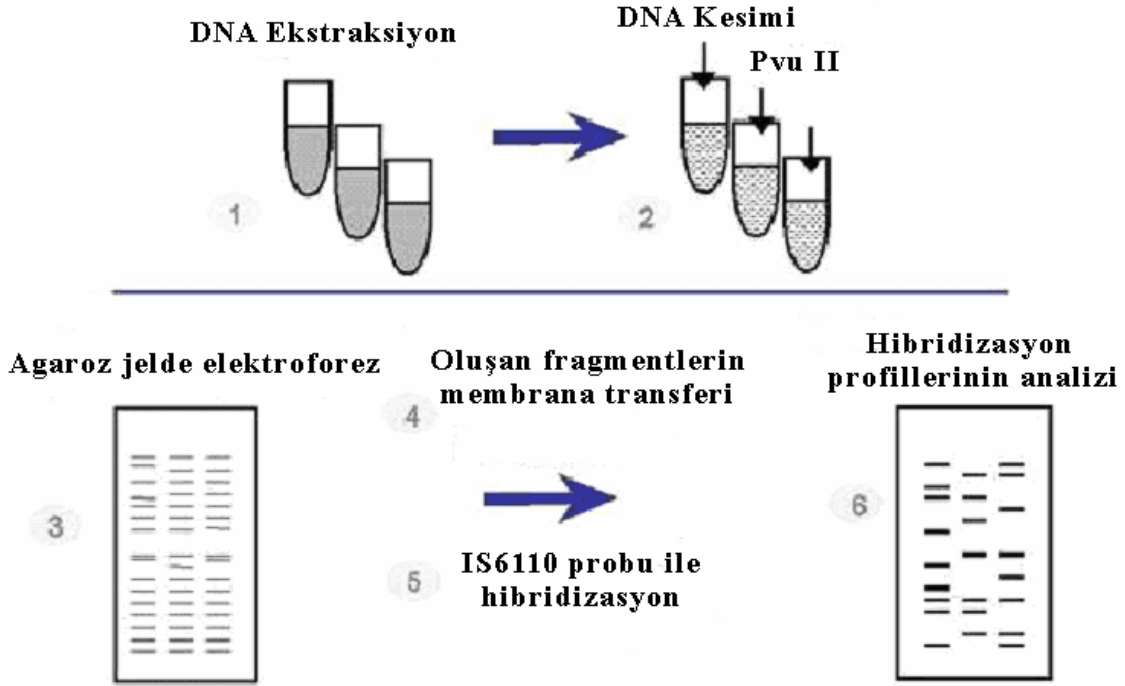
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP): Restriksiyon enzimleri çift sarmal DNA'yı çok özgül olarak belirli bölgelerden keserek parçalara ayıran enzimlerdir. DNA'nın bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezinde bantların ayrışması ve böylece DNA parçalarının büyüklüğü ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe RFLP adı verilir. Yöntem genel olarak DNA'nın

izolasyonu, restriksiyon enzimiyle kesim elektroforez, jelin görüntülenmesi ve yorumlanması aşamalarından oluşur.

Bu yöntemde kullanılacak enzimlerin seçiminde genomik DNA'yı en fazla 20 noktadan kesecek restriksiyon enzimi seçilmelidir. DNA'nın küçük parçalara ayrılması daha fazla bant oluşması anlamına gelir ki bu da sonuçların yorumlanmasını güçleştirmektedir. Bu yöntem temel alınarak çok sayıda yeni tiplendirme metotları geliştirilmiştir (35,36).

Hibridizasyon bazlı RFLP:

IS6110 RFLP: Mycobacterium tuberculosis' de bulunan tekrarlayan bölgelerden biri de IS (insertion element)dir. Bu güne kadar dört farklı yerleşim elementi *IS6110*, *IS1081*, *IS1547* ve *IS-like* tanımlanmıştır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı *IS6110* 'dur. Enterobakteriyel IS3 ailesine ait 1361 baz çiftlik bir yerleşim elementidir. *M. tuberculosis* kompleksinde suşdan suşa 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 kromozomal DNA'daki *IS6110* bölgeleri *PvuII* enzimi ile kesilmekte, ardından gecelik elektroforez yapılarak bantların ayrışması sağlanmaktadır. Alkali ortamda denatüre edilen jeldeki DNA, southern blotting yöntemi ile naylon membrana aktarılır. DNA membrana fikse edildikten sonra *IS6110* kesim bölgesinin sağ tarafı ile hibridize olan 521 baz çiftlik kemiluminesan veren maddeyle işaretli prop kullanılarak hibridizasyon yapılır. Elde edilen ışımaya x-ray film üzerine aktarılarak sonuçlar yorumlanır (Şekil 4). Yüksek seviyede ayırım gücünden dolayı yeni geliştirilen PZR bazlı yöntemlerin doğrulanmasında kullanılır. Yöntemin dezavantajı sekonder kültüre gereksinim duyulması , uzun zaman alması, deneyimli personel ihtiyacı ve en önemlisi de kopya sayısı 5 ve altında olan suşlarda ayırım gücünün yetersiz kalmasıdır. Ayrıca *IS6110* kopyası bulunmayan suşlarda sonuç alınamamaktadır (11-13,36).

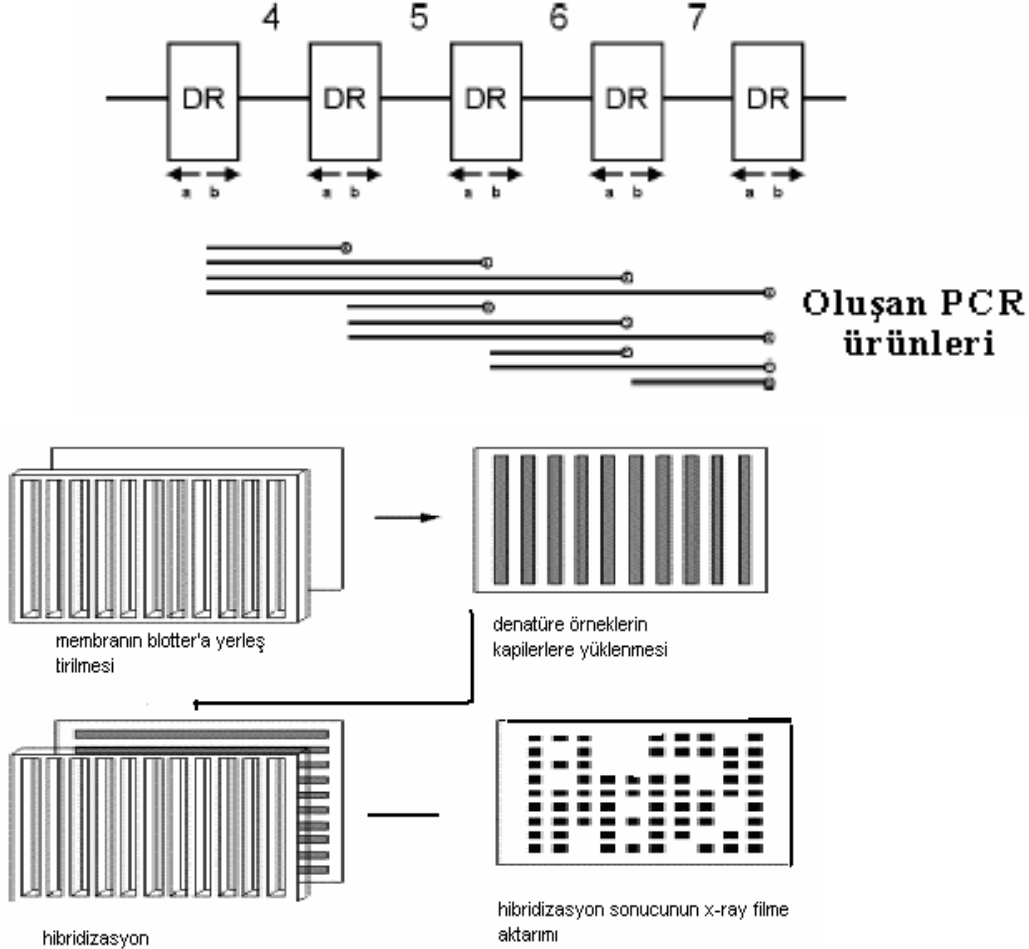


Şekil 4. IS6110 RFLP yönteminin şematik görünümü (52).

PGRS-RFLP: Sekonder tiplendirme yöntemlerinden biridir. IS6110 kopyası olmayan veya düşük sayıda kopya bulunduran *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesinde kullanılır. *M. tuberculosis* kompleksinde 96 baz çifti uzunluğunda yaklaşık 30 kopya kadar bulunan G-C zengin tekrarlayan bölge *AluI* enzimi ile kesilir, sonraki tüm basamaklar IS6110 RFLP ile aynıdır. IS6110 RFLP' den farklı olarak, pTBN12 *E.coli* plazmidinden elde edilen prop kullanılır. IS6110 RFLP ile benzer dezavantajlara sahiptir (36,44,45).

Spoligotiplleme: *M. tuberculosis* kompleksinde 36 baz çiftlik direkt tekrar (direct repeat DR) bölgeleri bulunmaktadır. DR lokusu olarak adlandırılan tek bir genomik lokusda bulunan bu yapıların arasında 35-41 baz çifti uzunluğunda özgü boşluk oluşturan dizilimler (spacer) bulunmaktadır. Hem DR'lerin sayısı hem de spacer dizilimlerinin varlığı suştan suşa farklılık gösterir. DR'lerin arasında 94 farklı spacer tanımlanmıştır, ancak bunlardan 43 tanesi tiplendirmede kullanılmaktadır. DR dizilimini hedef alan biyotinle işaretli primerler kullanılarak DR'lerin arasındaki farklı ayırıcı bölgeler çoğaltılmaktadır. Amplifikasyon ürünü ticari olarak elde edilen ve üzerinde 43 spacer'a ait prop bağlı membran ile hibridize edilir. Ayırıcı dizilimlerin varlığı veya yokluğu dijital olarak gözlenmektedir. Ayırıcı dizilimler suşlar arasında değişim göstermektedir ve hibridizasyon membranının sabitleşme yüzeyinde

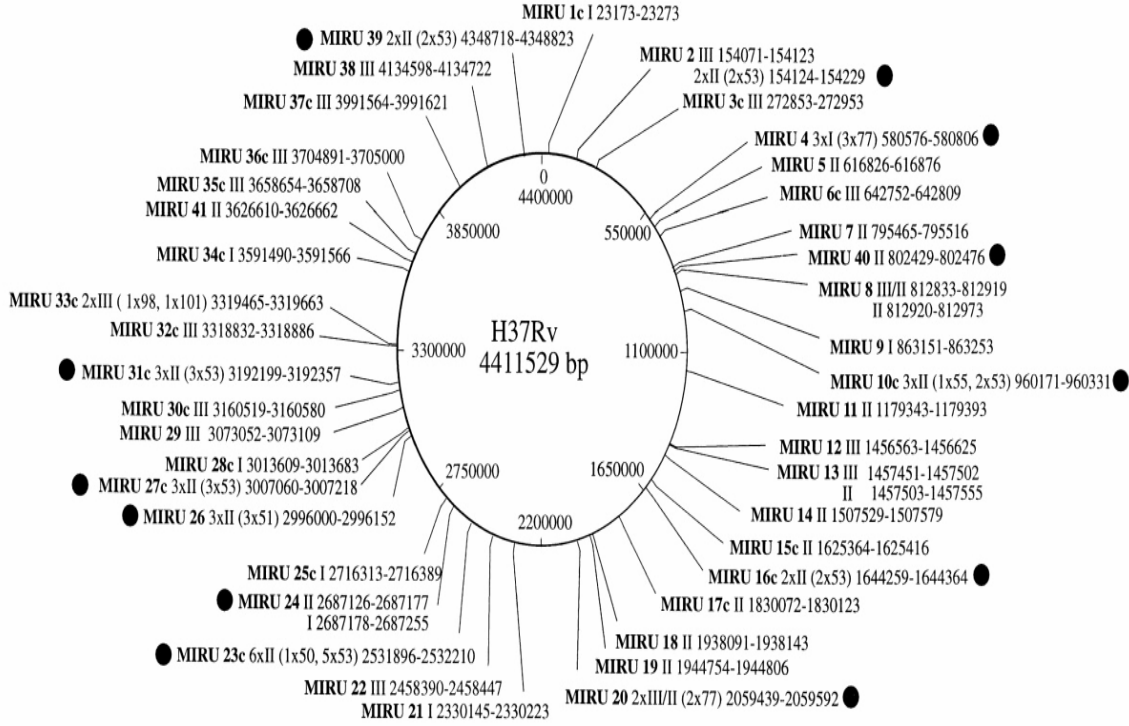
leke şeklinde görülmektedir. Reverse dot blot hibridizasyon metodudur (Şekil 5). Bu yöntemle *M. bovis*, *M. microti* ve *M. canettii* suşları kolayca tiplendirilebilmektedir. Basit hızlı ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Düşük IS6110 kopya sayılı suşların tiplendirilmesinde ayırım gücü yüksektir. Bu metot IS6110 RFLP'den sonra *Mycobacterium tuberculosis* 'in tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılan sekonder bir yöntemdir (13,36,46-48).



Şekil 5. Spoligotipleme yönteminin şematik görünümü (47).

Değişik sayıda sıralı tekrarlar içeren küçük uydulara dayalı metotlar:

M. tuberculosis genomunda 41 farklı MIRU (mycobacterial interspersed repetitive units) bölgesi tanımlanmıştır (Şekil 6). Bu lokuslar PZR bazlı tiplendirme metodunun temelini oluşturur. MPTR (majör polymorphic tandem repeat) ve ETR (exact tandem repeat) olmak üzere iki tip sıralı tekrar tanımlanmıştır (36,41).



Şekil 6. *M. tuberculosis* genomundaki 41 MIRU bölgesi (w.w.w.aphl.org.programs/infectious_diseases/shinnick.pdf)

MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units–variable numbers of tandem repeats): Değişik sayıda sıralı tekrarlar içeren küçük uyduların (minisatellitler) polimorfizmine dayalı bir yöntemdir. Sıralı tekrar lokuslarından (*tandem repeat loci*) elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizi yapılarak sıralı tekrarların sayısı ve bunların (*tandem repeats*) her iki yanında lokalize olmuş DNA segmentlerinin büyüklüğü belirlenmektedir. Genomda bağımsız halde bulunan 12 farklı lokustaki ‘tekrarlar’ değerlendirilir. Tekrarlar 52-77 oligonükleotid büyüklüğündedir. PZR ürünleri %2’lik agaroz jelde yürütülür, her lokustaki MIRU tekrarları bant büyüklüklerine göre değerlendirilir. Sonuçlar 12 rakamlı dijital formata çevrilir. Ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilir ve uygulaması kolay, çok merkezli çalışmalara uygun ve otomatize edilebilir bir yöntemdir (36,41).

ETR-VNTR(exact tandem repeat-variable numbers of tandem repeats):VNTR içeren 6 lokusun (ETR lokus A-F) amplifikasyonuna dayanan bir yöntemdir. ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E lokuslarına özel bir çift primerle amplifikasyon yapılmakta ve agaroz jel elektroforezinde amplifikasyon ürününün büyüklüğü ve her lokustaki ETR sayısı belirlenmektedir. Ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği MIRU-VNTR tiplene yönteminden daha düşüktür (36,41).

16S ve 23S rRNA : 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin arasında kalan ve suşlar arasında farklılık gösteren bölgelerin çoğaltılması ve sonrasında restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jel elektroforezinde oluşan restriksiyon enzim paternlerinin belirlenmesi şeklinde uygulanır. Yöntemin tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü diğer yöntemlerle kıyaslandığında yetersiz bulunmuştur (36,49).

Arbitrarily Primed (Random Amplified) PZR (RAPD): Bu yöntemde spesifik bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rastgele seçilen bir veya iki primerle DNA'daki bir çok bölgenin çoğaltılması esasına dayanır. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık agaroz jel elektroforezinde farklı büyüklükte ve sayıda bantların oluşmasına neden olur. Bu metot da kullanılan primerler 10-15 baz çiftlik kısa ve G-C ce zengindirler. Diğer amplifikasyon şartlarından farklı olarak primerlerin bağlanma ısıları (annealing) 40-50°C'ye düşürülmüştür. 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 (35,36,50,51).

PZR bazlı yöntemlerden biri de tekrarlayan bölgelerin arasında kalan bölgelerin çoğaltılmasıdır. Yöntemde iki tekrarlanan element olan *IS6110* ve *PGRS*'nin arasında kalan DNA parçalarının çoğaltılması yapılmaktadır. Tekrarlayan bölgelerin sayısı ve aralarındaki uzaklık bant polimorfizmine neden olmaktadır. Yöntem %96'lık prediktif değere sahiptir ve oluşan paternlerin epidemiyolojik çalışmalara uygun olduğu görülmüştür. İki tekrarlayan elementin arasındaki bölgelerin amplifikasyonu için dört adet primer kullanılmaktadır. *IS6110* için *R1s1* ve *R1s 2*, *PGRS* için *Ptbn1* ve *Ptbn2* primerleri kullanılmaktadır. Primerler tekrar bölgelerin her iki ucundan dışa bakacak şekilde dizayn edilmiştir. Yöntemin tekrarlanabilirliği düşük fakat ayırım gücü yüksek bulunmuştur. Bu nedenle primer tipleme metotlarıyla grup içinde bulunan suşların doğrulanması amacıyla kullanılabilir (36).

MATERYAL METOD

M. tuberculosis suşları: 1 Ocak 2000–31 Aralık 2005 yılları arasında İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Malatya Devlet Hastanesi ve Malatya Verem Savaş Dispanserlerine tüberküloz ön tanısı ile gelen hastalardan izole edilerek tür tayini ve duyarlılık testleri yapılmış 200 suş ile, tür tayini ve duyarlılık testleri ilgili merkezlerce yapılmış ve çoğunlukla dirençli olanların seçildiği Marmara bölgesinden 150 (1 Ocak 2003-31 Aralık 2005), Ege bölgesinden 50 (1 Ocak 1999- 31 Aralık 2001) ve Akdeniz bölgesinden 50 suş (1 Ocak 2001-31 Aralık 2004) olmak üzere toplam 450 *M. tuberculosis* izolatu çalışma kapsamına alınmıştır. Her hastadan tek izolat alınmıştır.

Moleküler tipleme: Suşların tamamı IS6110 RFLP ve Spoligotipleme yöntemleriyle tiplendirildi.

DNA izolasyonu: van Soolingen ve ark. (12) tarafından geliştirilmiş olan CTAB (N-cetyl-N, N, N-trimethyl amonyum bromür) yöntemi kullanıldı. Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiş *M. tuberculosis* kolonileri eküvyonlu çubukla bolca toplanarak 500 µl TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH:8) tamponu içinde süspansiyon edildi. Çalışma güvenliği açısından ekstraksiyon işlemlerine geçilmeden önce 80°C de 20 dakika su banyosunda bekletilerek bakterinin ölmesi sağlandı. Ekstraksiyon şu aşamalardan oluşmaktadır:

Enzimatik Liziz: Isı ile inaktive edilen bakteri süspansiyonunun üzerine, TE tamponu içinde hazırlanmış ve 20 mg/ml yoğunlukta olan lizozim enziminden 50 µl kondu. Vorteks yapılarak 37°C de 2 saat inkübe edildi. Örneklere 70 µl %10'luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 12 µl 10 mg/ml Proteinaz K enziminden eklenerek 65°C de 30 dakika bekletildi.

DNA'nın saflaştırılması: NaCl (5M) 100 µl ve 80 µl %10 CTAB eklenip, sütlü bir görünüm olana kadar vortekslendi. 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. Taze hazırlanmış kloroform/ izoamil alkol (24:1) karışımından 600-700 µl eklendi. Vorteks yapıldıktan sonra 13.000 g de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe alınarak kloroform/ izoamil alkol aşaması tekrar edildi. Üst kısım yeni bir tüpe alınarak -20°C de bekletilmiş isopropanoldan 500 µl eklendi, 10-15 saniye vortekslendikten sonra -70°C de en az bir saat bekletildi. Oda ısısında 13.000 g de 15 dakika santrifüj yapıldıktan sonra, üst faz atıldı. Tüpün tabanında kalan DNA yıkandı.

DNA'nın yıkanması: Pelet üzerine 1 ml soğuk %70'lik etanol eklendi. 13.000 g de 10 dakika santrifüj edildi. Alkol dökülerek peletin kuruması sağlandı. Pelet 50 µl TE tamponu ile

homojenize edildi. 37°C de 1 saat bekletildikten sonra UV spektrometre kullanılarak iki farklı dalga boyunda (260/280 nm) ölçüm yapılarak DNA ve protein miktarları belirlendi (11,12).

IS6110 RFLP uygulaması:

Genomik DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesimi:

Her örnek ve standart (*M. tuberculosis* H37Rv) için 20µl içinde 2 µg DNA olacak şekilde aşağıdaki karışım hazırlandı;

DNA ve distile su.....17µl

10 X Enzim tamponu.....2µl

Pvu II (10 IU/µl)..... 1µl

Karışım, 2 saat 37°C de su banyosunda inkübe edildi. Kesimi durdurmak için tüplere 5µl 5X bromfenol mavisi (Brom fenol mavisi 40 mg, Gliserol 5ml, EDTA 0.5M'dan 1.5 ml ve Su 3.5ml) eklendi.

Enzimle kesim aşamasının kontrolü: TBE (Tris 100 mM-Borik asit100 mM-EDTA 20mM) tamponu içinde hazırlanmış % 0.8 'lik agaroz jele, 5 µl örneklerden yüklenerek 120 volt/2 saat elektroforez uygulandı. Kesim ve örneklerin yoğunluğa bakıldı. En az yoğun olandan 20 µl olacak şekilde gecelik elektroforez jeline yüklenecek örnek miktarı hesaplandı. Burada amaç elektroforez sonrasında tüm örneklerdeki bant yoğunluğunun aynı olmasını sağlamaktır.

Gecelik elektroforez: TBE (1X) tamponu içinde hazırlanmış %1'lik agaroz (etidyum bromürsüz) 15X20 cm'lik kalıpta hazırlandı. Örneklerden jele uygun miktarda yüklendi. Moleküler ağırlık standardı olarak kullanılacak olan H37Rv'den hazırlanmış olan DNA örneğinden, başa ortaya ve sona asimetri oluşturacak şekilde (örnek sırasını belirlemek için) yükleme yapıldı. İlk 10 dakika 100 volt uygulanarak örneklerin kuyucuklardan çıkması sağlandı. Daha sonra akım 50 volta düşürülerek 16.5 saat elektroforez yapıldı. Jel etidyum bromür (500 µg/l) ile 10 dakika boyandıktan sonra görüntülendi.

Southern blotting:

Jeldeki DNA'nın denatürasyonu: Jelde çift sarmal halde bulunan DNA, blotlama işleminden önce, 500 ml transfer solusyonu içinde (NaOH 10N+NaCl 5M) oda ısısında, 30 dakika 25 rpm'de çalkalanarak denatüre edildi.

Blotlama: 500 ml transfer solusyonu (NaOH 10N + NaCl 5M) blotlama yapılacak uygun bir plastik kaba kondu. Gecelik elektroforez jel kalıbı ters çevrilerek kabın içine yerleştirildi. Whatman 3M filtre kağıdından 15X30 cm ebadında 2-3 adet köprü oluşturacak

şekilde kalıbın üzerine yerleştirildi ve uç kısımlarının transfer solusyonuna temas etmesi sağlandı.

Denatüre edilen jel iki plastik levha arasına alınarak ters çevrildi. Jel yine plastik levha yardımıyla dikkatli bir biçimde kaydırılarak filtre kağıdı üzerine alındı. Jel ile filtre kağıdı arasında hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. 14X20 cm boyutlarında kesilmiş, uzun kenarın orta kısımları ve sağ alt köşesi işaretli naylon membran transfer solusyonu ile ıslatıldıktan sonra jelin üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Membranın üzerine 3-4 adet (14X20cm) Whatman 3M filtre kağıdı ıslatılarak kapatıldı. Bunun üzerine yaklaşık 12-13 cm yüksekliğinde jelin enine uygun olarak katlanmış kağıt havlular yerleştirilerek plastik kabın kapağı kapatıldı. 4.5 saat oda ısısında bekletildi.

Nötralizasyon: Blotlama işleminin bitiminde membran yazılı yüzü yukarı gelecek şekilde 300 ml nötralizasyon tamponu (TrisHCl 2M + NaCl 5M pH 7.8) bulunan kabın içine alınarak 30 dakika oda ısısında çalkalandı.

DNA'nın membrana fiksasyonu: Filtre kağıdının üzerine alınan membran iyice kuruduktan sonra pastör fırınında 80°C'de 2 saat bekletilerek DNA'nın membrana sabitlenmesi sağlandı.

IS6110 probun elde edilmesi ve işaretlenmesi: *M. tuberculosis* H37Rv veya *M. bovis* BCG standart suşlarının DNA'sından hazırlanan prob kullanıldı. IS6110 kesim bölgesinin sağ tarafıyla hibridize olan 521 baz çiftlik bölge p43 (5'- TCA GCC GCG TCC ACG CCG CCA-3'), p53(5'-CCG ACC GCT CCG ACC GAC GGT-3') primerleri kullanılarak çoğaltıldı.

Amplifikasyon tüpünün içeriği:

2X amplifikasyon karışımı*	25µl
p43 (20 pmol/µl)	0.5µl
p53 (20 pmol/µl)	0.5µl
TaqDNA pol. (5 IU/µl)	0.3µl
Distile su (DNaz, RNaz free)	18.7µl

*2X Amplifikasyon miksinin içeriği: 10X Enzim tamponu, 1.5mM MgCl, 2.5 mM dNTP miks, 1mM Bovin Serum Albumin (BSA) ve DNaz RNaz içermeyen su.

Amplifikasyon programı

Başlangıç denatürasyonu	94°C	5 dakika	→	1 kez	
Denatürasyon	94°C	} 1.5 dakika			
Bağlanma	60°C		1.45 dakika		30 kez
Uzama	72°C		2.5 dakika		
Ek uzama	72°C	10 dakika	→	1 kez	

Amplifikasyon ürünü %0.8'lik agaroz jel de 120 volt/2 saat elektroforeze tabi tutuldu. Uygun bir marker yardımıyla 521 baz çiftlik ürünün yeri tespit edildi. Sonra, UV ışık altında 521 bç DNA bandı kesildi. Jelden DNA ekstraksiyon kiti (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Promega Corp. Madison, WI, USA) kullanılarak prop saflaştırıldı. DNA ölçümü yapılarak yoğunluğu 10 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

Prob'un işaretlenmesi: 10 ng/µl yoğunluktaki proptan her membran için 15µl alınarak bir eppendorf tüpe konularak, 95°C'lik kaynayan suda 5 dakika denatüre edildi.

Hemen kırık buz içine alındı ve burada da 5 dakika bekletildi. Kısa süreli santrifüj yapıldı. Prop miktarı kadar "labelling reagent" ve gluteraldehit (ECL Amersham Biosciences UK Limited Buckinghamshire, England) sırayla eklendi, hafifce pipetaj yapıldıktan sonra 37°C de 10 dakika inkübe edildi. Kısa süreli santrifüjün ardından prop hibridizasyon için hazırlanmış oldu.

Hibridizasyon: Ön ısıtma işlemi için hibridizasyon fırını 42°C'ye getirildi. Her membran için 20 ml -20°C'de saklanan hibridizasyon tamponu bir saat ısıtıldı. Hibridizasyon yapılacak membranlar rulo haline getirilerek hibridizasyon tüpüne yerleştirildi. Önceden ısıtılmış hibridizasyon tamponu hibridizasyon tüpüne dik durumda iken kondu. Sonra tüp yan yatırıldı. Tampon önce membranın merkezi boyunca hareket ettirildi, sonra aşağı yukarı hareketle tüpü sağa sola döndürerek hava kabarcığı kalmayacak şekilde membranın ıslanması sağlandı.

Hibridizasyon tamponu + membran 42°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu arada prop işaretlendi.

İşaretli proptan 45µl hibridizasyon tüpüne eklenerek 42°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı.

Membranın yıkanması: Primer yıkama solusyonu (her membran için 100ml) 42°C'ye ayarlanır, aynı ısıda membran 2 kez 20 dakika yıkandı. Membran, sekonder yıkama solusyonu (her membran için 300ml) ile oda ısısında 2 kez 5 dakika çalkalamalı etüvde bekletildi.

Hibridizasyon sonucunun gözlenmesi: Membran eşit olarak karıştırılmış "Detection reagent 1-2" (ECL Amersham Biosciences UK Limited Buckinghamshire, England) bulunan kaba konur bir dakika bekletildikten sonra şeffaf dosya arasına veya streç filme sarılarak mümkün olan en kısa sürede kasetteki X-ray filmin altına yerleştirilir. Dört saat sonra film geliştirilir.

Görüntü dijital kamera kullanılarak (Nikon E995 Coolpix Tokyo 100-8331, Japan) bilgisayar ortamına alındı. Analizleri GelCompar II (version 3.5 Applied Math, Ghent,

Belgium) programı kullanılarak yapıldı (11,45,52). Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltiler Ek1'de verilmiştir.

Tipleme sonuçlarının yorumlanması:

Farklı (özgü=unique) suşlar: IS6110 RFLP bant sayısı >6 olup, aralarında ortak bant bulundurmeyen suşlar

Benzer suşlar: IS6110 RFLP bant sayısı >6 olup, aralarında bir bant farkı olan suşlar.

Küme (cluster) oluşturan suşlar:

1-IS6110 RFLP bant sayısı >6 olup, aralarında bant farkı olmayan (%100 aynı olan) suşlar

2- IS6110 RFLP profilleri benzer, spoligotip profilleri aynı olan suşlar

3- IS6110 RFLP bant sayısı <5 olup aynı bant sayısına sahip olan suşlar spoligotipleme ile de aynı ise küme içinde tanımlandı (53).

Spoligotipleme

Genomik DNA'nın Amplifikasyon: Kamerbeek ve ark. tarafından tanımlanan protokol modifiye edilerek kullanıldı (46,47,52). Amplifikasyon, CTAB yöntemi ile elde edilen DNA'ların biyotinle işaretli DRa ve DRb primerleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Primerlerin dizilimi:

DRa 5' GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3' (5' biyotinli)

DRb 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'

Örneklerin ve pozitif kontrol olarak kullanılacak olan H37Rv ve *M. bovis* BCG suşlarının DNA'sı uygun konsantrasyonlarda sulandırıldı (en az 10 ng/µl DNA).

Amplifikasyon tüpünün içeriği:

2X amplifikasyon miksi*12.5 µl

Primer Dra (10pmol/µl)2 µl

Primer Drb (10pmol/µl)2 µl

Taq DNA pol. (5 U/µl) 0.3 µl

Su (DNAaz-RNaz free)5.7 µl

Toplam 22.5 µl

Kalıp DNA 2.5 µl

*2X Amplifikasyon miksinin içeriği: 10X Enzim tamponu, 1.5mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP miksi, 1mM Bovin Serum Albumin (BSA) ve DNAaz-RNaz içermeyen su.

Amplifikasyon programı:

Başlangıç denatürasyonu	94°C	5	dakika	→	1 kez
Denatürasyon	94°C	1	dakika	}	25 kez
Bağlanma	55°C	1	dakika		
Uzama	72°C	45	saniye		
Ek uzama	72°C	10	dakika	→	1 kez

PZR Ürünüün Hibridizasyonu:

Membranın ısıtılması: 20mM EDTA içinde 4°C de saklanan membran kullanılmadan önce 2xSSPE + % 0.1 SDS ile 60°C de 5 dakika ısıtıldı.

Denatürasyon: Amplifikasyon tüplerine 150 µl 2xSSPE + %0.1 SDS eklenir, 100°C de 10 dakika kuru ısı bloğunda denatüre edildi.

Hibridizasyon: Miniblotter'ın alt kapağına sünger yastığı yerleştirip üzerine plastik penset yardımıyla kesik kısmı sol üst köşeye gelecek şekilde membran dikkatlice yerleştirildi. Miniblotter'ın üst kapağını kapattıktan sonra tüm kapillerlerin içindeki sıvı aspire edildi.

Denatüre edilmiş örnekler hava kabarcığı kalmayacak şekilde, yaklaşık 150-160 µl kadar kapillerlere yüklendi ve 60°C' de bir saat inkübe edildi.

Membranın Yıkınması: İnkübasyon sonunda hibridizasyon sıvısının tamamı aspire edildi ve membran 2xSSPE + %0.5 SDS ile iki kez 60°C' de 10 dakika yıkandı.

Konjugat Eklenmesi: Membran oda ısısına geldikten sonra şeffaf bir dosya arasına alınarak, 10 ml 2xSSPE + %0.5 SDS ve 10 µl Streptavidin horseradish peroksidaz (ECL Amersham Biosciences UK Limited Buckinghamshire, England) eklendi. Hava kabarcıkları uzaklaştırıldıktan sonra plastik kapatıcı yardımıyla kapatılarak 42°C de bir saat inkübe edildi. (Bu aşamada streptavidinin membranın her tarafına temas edebilmesi için, hibridizasyon torbası düz bir zemine bırakılmalıdır).

Membranın Yıkınması: 200 ml 2xSSPE + %0.5 SDS ile iki kez 42 °C de 10 dakika membran yıkandı.

Görüntüleme: Membran, eşit olarak karıştırılmış "Detection reagent 1-2" (ECL Amersham Biosciences UK Limited Buckinghamshire, England) kabına konur, bir dakika bekletildikten sonra, şeffaf bir dosya arasına alınarak etrafı kapatılır. En kısa sürede membran birinci kasetteki X-ray filmin altına yerleştirilir. Bir dakika bekletildikten sonra membran ikinci kasete alınarak bir dakikalık filmin ışığa şiddetine göre ikinci kasetin bekleme süresi belirlendi.

Membranın Regenerasyonu: Membran %1 SDS ile iki kez 80°C de 30 dakika yıkandı. EDTA 20mM (pH: 8.0) ile 15 dakika oda ısında bekletildi. Membran 20 ml EDTA (20mM pH: 8.0) bulunan şeffaf dosya içine alındı. Plastik kapatıcı ile kapatılarak +4°C de kullanım sayısı ve tarih yazılarak saklandı (46,47,52).

Sonuçlar bir bilgisayar programı kullanılarak, hibridize olan ve olmayan alanları şematik olarak gösteren “hibridizasyon kod” ve 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan “oktal kod” formatına çevrildi. Elde edilen veriler SpolDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/ outilsConsultation.jsp>) veri tabanı kullanılarak kümeler “paylaşılan tip (PT)” ve familyalar (clade) belirlendi (13,46-48). Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltiler Ek2’de verilmiştir.

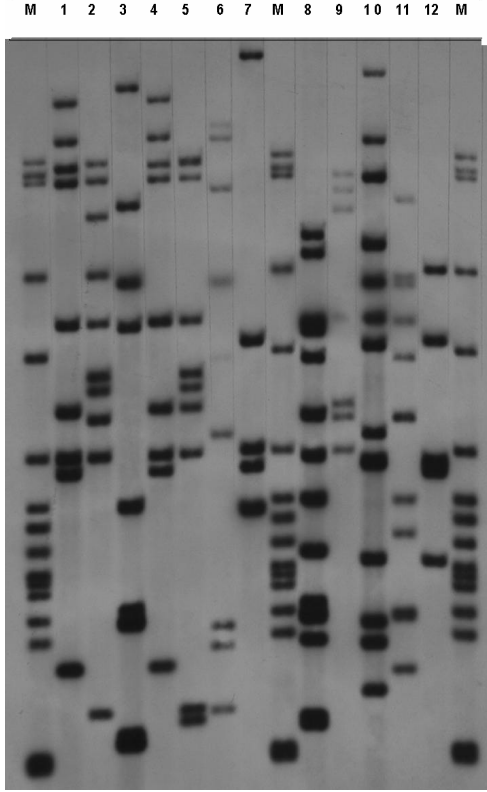
BULGULAR

Ocak 2000–Aralık 2005 tarihleri arasında Malatya’daki tüberkülozlu hastalardan izole edilen 200 suş ile Marmara bölgesinden 150, Akdeniz bölgesinden 50 ve Ege bölgesinden 50 olmak üzere toplam 450 *Mycobacterium tuberculosis* suşu IS6110 RFLP ve Spoligotiplleme yöntemleri kullanılarak tiplendirildi. Suşların bölgelere dağılımı ve antitüberküloz ilaçlara direnç durumları Tablo 1’ de görülmektedir.

Tablo1 . Suşların bölgeler ve direnç profillerine göre dağılımı.

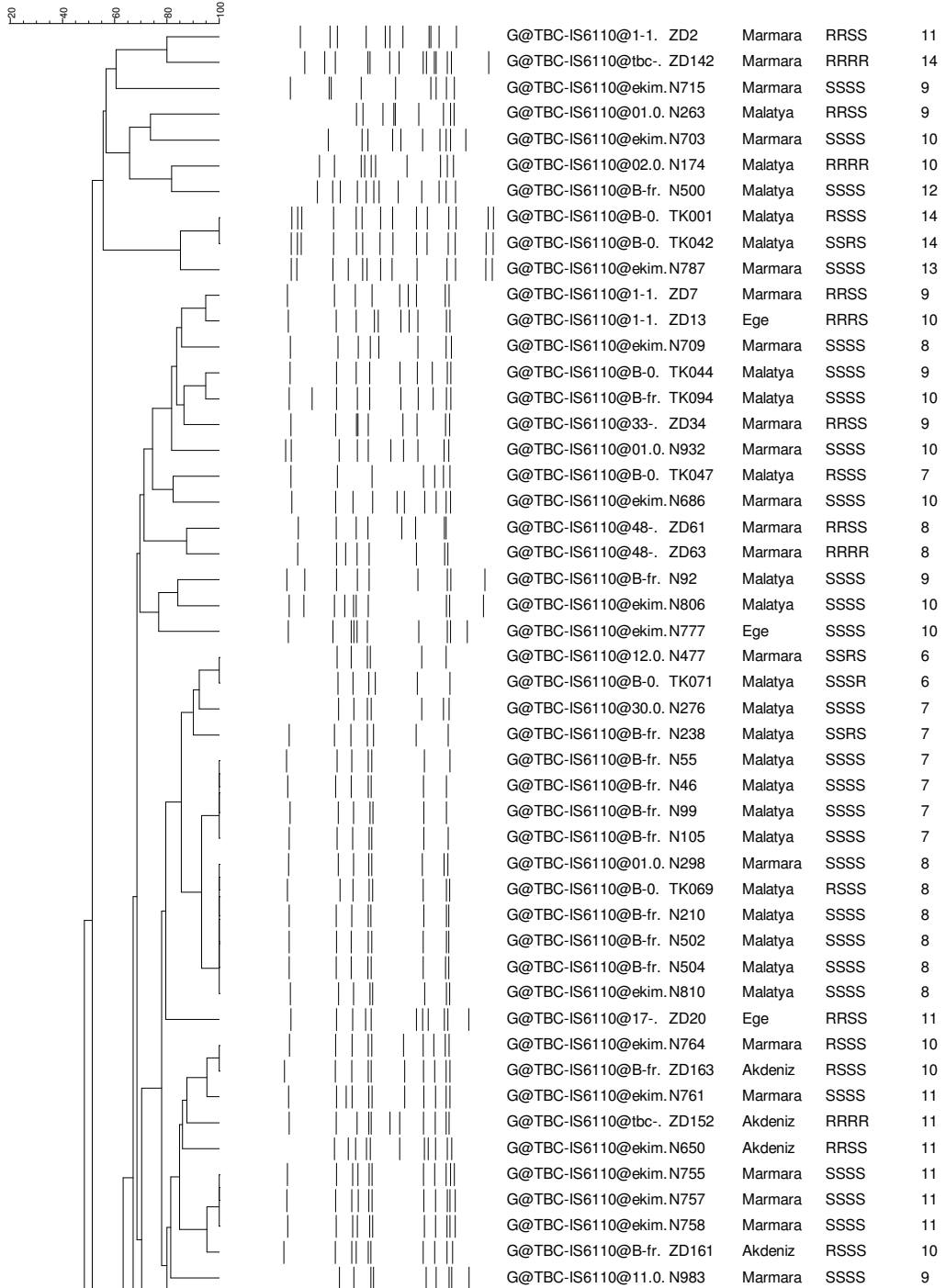
İLAÇLAR	MALATYA	MARMARA	EGE	AKDENİZ
İZONİAZİD (INH)	22	9	3	9
RİFAMPİSİN (RIF)	4	8	3	1
STREPTOMİSİN (SM)	22	4	2	2
ETAMBUTOL (ETB)	4	1	1	4
INH+RIF	5	23	6	8
INH+ETB	-	-	-	1
INH+SM	3	2	1	5
RIF+SM	1	-	-	-
RIF+ETB	-	-	1	-
SM+ETB	2	4	1	-
INH+RIF+SM	-	11	13	5
INH+RIF+ETB	1	4	3	3
INH+RIF+SM+ETB	7	23	7	4
DUYARLI	129	61	9	8
TOPLAM	200	150	50	50

IS6110 RFLP analizi ile 304 farklı patern belirlenmiştir. IS6110 RFLP tiplleme sonucunu gösteren örnek bir membran Şekil 7’de, analiz edilen 450 suşun GelCompar II software (version 3.5 Applied Math, Ghent, Belgium) programı kullanılarak yapılan dendogram sonuçları da Şekil 8’de verilmiştir. İki yüz üç örneğin bulunduğu 57 küme (kümeleşme oranı: %45.1) ve 175 özgü profil (%38.9) tespit edilirken, 72 (%16) suş benzer bulunmuştur.



Şekil 7. IS6110 RFLP tiplene sonucunu gösteren örnek bir membran. 1-12 özgü profil gösteren *M.tuberculosis* izolatları. M: moleküler standart. (H37Rv standart suşu *Pvu*II enzimi ile kesilerek kullanıldı)

IS6110



	G@TBC-IS6110@B-fr. ZD161	Akdeniz	RSSS	10
	G@TBC-IS6110@11.0. N983	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@ekim. N798	Ege	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@ekim. N754	Marmara	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD101	Ege	SRSR	8
	G@TBC-IS6110@ekim. N699	Marmara	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@ekim. N730	Marmara	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@33-. ZD41	Ege	SSSR	6
	G@TBC-IS6110@33-. ZD33	Marmara	SRRS	13
	G@TBC-IS6110@ekim. N802	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@33-. ZD39	Akdeniz	SSSR	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK056	Malatya	RSSS	7
	G@TBC-IS6110@ekim. N750	Marmara	SSSS	6
	G@TBC-IS6110@1-1. ZD14	Marmara	RRSS	9
	G@TBC-IS6110@B-0. TK002	Malatya	SSRS	8
	G@TBC-IS6110@48-. ZD56	Akdeniz	SSRS	9
	G@TBC-IS6110@02.0. N221	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@B-fr. ZD164	Akdeniz	RRRS	10
	G@TBC-IS6110@B-fr. ZD158	Akdeniz	RRSS	10
	G@TBC-IS6110@B-0. TK061	Malatya	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-bi. N286	Malatya	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-bi. N308	Malatya	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@66-. ZD71	Marmara	RRRR	10
	G@TBC-IS6110@B-fr. TK086	Malatya	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD98	Ege	RRRS	10
	G@TBC-IS6110@B-fr. ZD162	Akdeniz	RSSS	8
	G@TBC-IS6110@12.0. N432	Malatya	SSSS	6
	G@TBC-IS6110@ekim. N752	Akdeniz	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-fr. N77	Malatya	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD120	Ege	RRSR	4
	G@TBC-IS6110@11.0. N431	Malatya	SSSS	3
	G@TBC-IS6110@11.0. N949	Marmara	RSSS	5
	G@TBC-IS6110@ekim. ZD127	Marmara	RRRR	7
	G@TBC-IS6110@ekim. N738	Marmara	RRRR	7
	G@TBC-IS6110@30.0. N282	Malatya	SSSS	4
	G@TBC-IS6110@B-fr. N75	Malatya	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@30.0. N250	Malatya	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@B-fr. N505	Malatya	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@30.0. N234	Malatya	SSRS	8
	G@TBC-IS6110@11.0. N436	Marmara	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@ekim. N774	Ege	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@30.0. N300	Malatya	SSSS	14
	G@TBC-IS6110@ekim. N700	Marmara	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@ekim. N789	Ege	SSSS	13
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD106	Ege	RRSS	10
	G@TBC-IS6110@66-. ZD73	Marmara	RRRS	15
	G@TBC-IS6110@ekim. N779	Ege	SSSS	13
	G@TBC-IS6110@ekim. N713	Marmara	RSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-fr. ZD159	Akdeniz	RSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-fr. ZD167	Akdeniz	RRRS	8
	G@TBC-IS6110@17-. ZD24	Akdeniz	RRSS	9
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD150	Akdeniz	RRSS	9
	G@TBC-IS6110@B-fr. N261	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@ekim. N698	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@01.0. N449	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@17-. ZD32	Marmara	RRSS	12

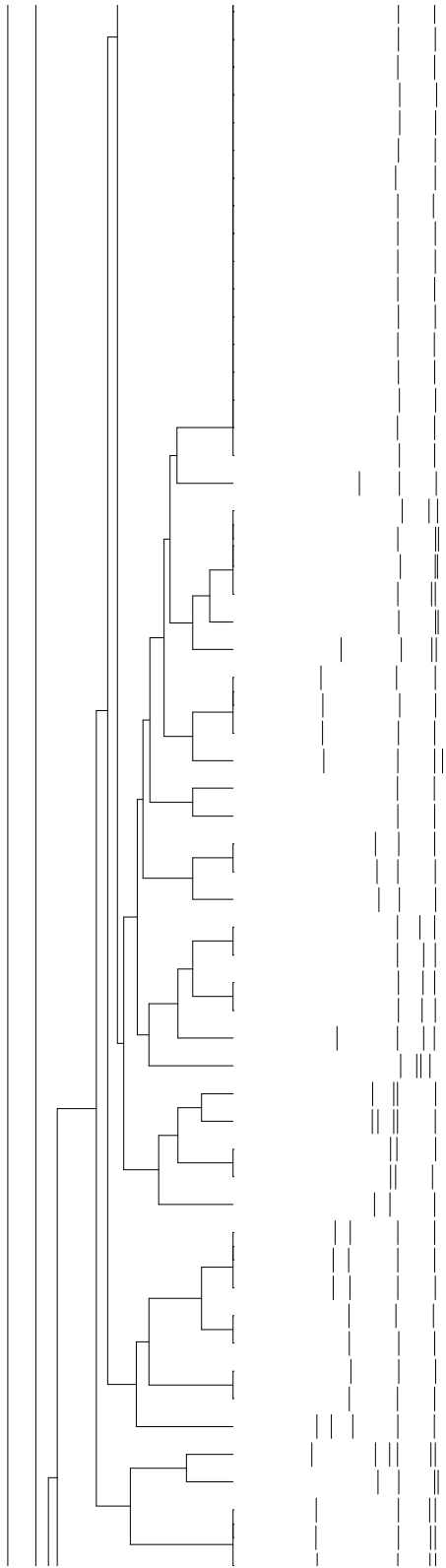
	G@TBC-IS6110@01.0. N449	marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@17-. ZD32	Marmara	RRSS	12
	G@TBC-IS6110@B-0. TK034	Malatya	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@B-fr. N3	Malatya	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@ekim. N804	Malatya	RSRS	12
	G@TBC-IS6110@66-. ZD72	Marmara	SRSS	14
	G@TBC-IS6110@12.0. N930	Marmara	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@66-. ZD79	Marmara	RRRR	9
	G@TBC-IS6110@11.0. N489	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@30.0. N297	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-0. TK026	Malatya	SSSR	10
	G@TBC-IS6110@17-. ZD31	Marmara	RRSR	9
	G@TBC-IS6110@B-fr. TK030	Malatya	SSRS	10
	G@TBC-IS6110@B-0. TK048	Malatya	SSRS	10
	G@TBC-IS6110@ekim. N812	Malatya	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@30.0. N316	Malatya	SRSS	9
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD133	Marmara	RRSS	10
	G@TBC-IS6110@B-0. TK004	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-0. TK076	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@66-. ZD80	Marmara	RRRS	7
	G@TBC-IS6110@82-. ZD92	Marmara	SRSS	7
	G@TBC-IS6110@B-0. TK090	Malatya	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@B-fr. N6	Malatya	SSRS	7
	G@TBC-IS6110@ekim. N701	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@ekim. N786	Akdeniz	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-0. TK092	Malatya	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@ekim. N696	Marmara	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-fr. N151	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@ekim. N711	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-0. TK087	Malatya	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@B-fr. N144	Malatya	RRSS	7
	G@TBC-IS6110@B-fr. N102	Malatya	RRSS	7
	G@TBC-IS6110@ekim. N762	Marmara	RRSS	7
	G@TBC-IS6110@ekim. N773	Marmara	RRRR	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK075	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK007	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK089	Malatya	SSRS	8
	G@TBC-IS6110@B-fr. N29	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@ekim. N691	Marmara	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@82-. ZD85	Ege	SSRS	9
	G@TBC-IS6110@48-. ZD62	Akdeniz	RSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-fr. N53	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD139	Marmara	RSRS	7
	G@TBC-IS6110@ekim. N760	Marmara	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@66-. ZD74	Marmara	SRSS	7
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD119	Ege	RRRR	11
	G@TBC-IS6110@ekim. 731=769	Marmara	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD110	Ege	RRSS	8
	G@TBC-IS6110@12.0. N973	Malatya	SSRS	6
	G@TBC-IS6110@ekim. N765	Marmara	SSRR	11
	G@TBC-IS6110@ekim. N748	Marmara	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@12.0. N463	Marmara	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-0. TK040	Malatya	RSSS	9
	G@TBC-IS6110@ekim. N749	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-fr. N73	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-fr. N20	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK014	Malatya	SSSS	8

	G@TBC-IS6110@B-fr. N20	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK014	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK041	Malatya	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@1-1. ZD1	Ege	SSRS	8
	G@TBC-IS6110@ekim.N756	Marmara	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@12.0. N476	Akdeniz	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-fr. N148	Malatya	SSRS	7
	G@TBC-IS6110@B-fr. N5	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@66-. ZD78	Marmara	RRR?	9
	G@TBC-IS6110@B-0. TK011	Malatya	SSRS	8
	G@TBC-IS6110@B-fr. N146	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@B-0. TK095	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@ekim.N815	Malatya	RSRS	8
	G@TBC-IS6110@ekim.N772	Ege	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-0. TK024	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@ekim.N788	Malatya	SSRS	10
	G@TBC-IS6110@ekim.N796	Malatya	SSRS	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK059	Malatya	RSSS	8
	G@TBC-IS6110@ekim.N692	Marmara	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-fr. N14	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-0. TK067	Malatya	SSRS	8
	G@TBC-IS6110@B-fr. N54	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@ekim.N720	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@ekim.N736	Marmara	RSSS	8
	G@TBC-IS6110@ekim.N781	Marmara	RRRR	8
	G@TBC-IS6110@ekim.N725	Marmara	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@tbc-. N59	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@1-1. ZD5	Marmara	RRRR	10
	G@TBC-IS6110@33-. ZD42	Marmara	RRSS	10
	G@TBC-IS6110@ekim.N791	Malatya	SSRR	9
	G@TBC-IS6110@33-. ZD43	Akdeniz	SSSR	10
	G@TBC-IS6110@48-. ZD60	Akdeniz	RSSS	10
	G@TBC-IS6110@ekim.N759	Marmara	SSRR	12
	G@TBC-IS6110@ekim.N702	Marmara	SSRR	12
	G@TBC-IS6110@11.0. N960	Malatya	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@30.0. N291	Malatya	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD135	Marmara	RSSS	8
	G@TBC-IS6110@48-. ZD55	Marmara	RRSS	10
	G@TBC-IS6110@82-. ZD91	Marmara	SRSS	11
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD122	Ege	RRRR	10
	G@TBC-IS6110@B-fr. ZD157	Akdeniz	RSRS	9
	G@TBC-IS6110@82-. ZD95	Marmara	RRRS	8
	G@TBC-IS6110@ekim.N778	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@17-. ZD29	Marmara	RRSS	10
	G@TBC-IS6110@ekim.N704	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@66-. ZD70	Akdeniz	SSSR	11
	G@TBC-IS6110@82-. ZD82	Akdeniz	SSSR	12
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD99	Ege	RRRS	11
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD102	Ege	RRRR	11
	G@TBC-IS6110@B-fr. TK031	Malatya	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@B-fr. N8	Malatya	SSSS	13
	G@TBC-IS6110@ekim.N799	Ege	RSSS	14
	G@TBC-IS6110@B-fr. N71	Malatya	RRSS	13
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD123	Marmara	RRRR	13
	G@TBC-IS6110@11.0. N450	Marmara	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@ekim.N716	Marmara	SSSS	8

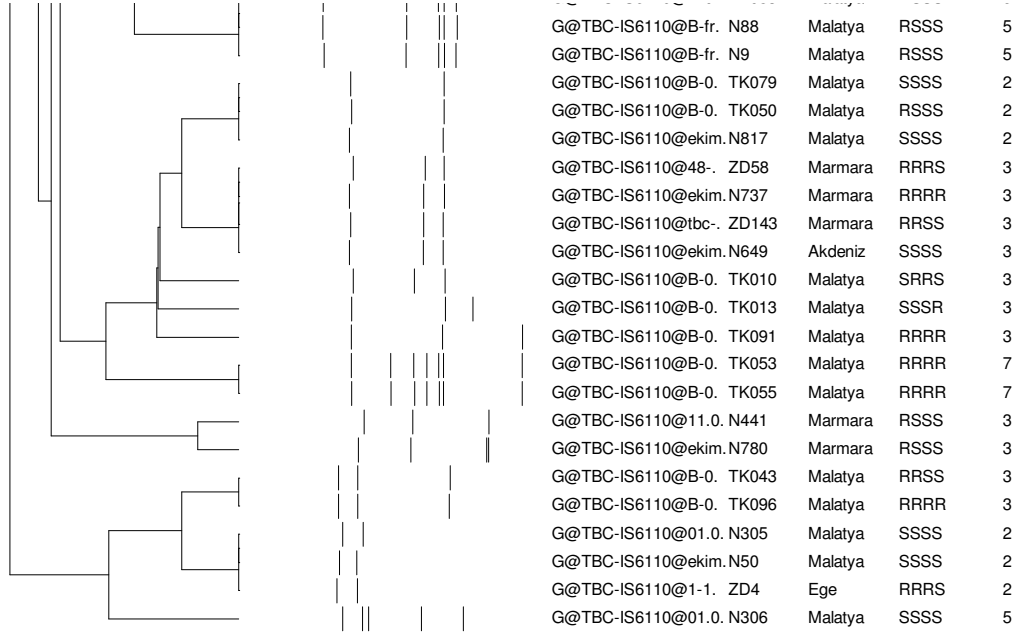
	G@TBC-IS6110@11.0. N450	Marmara	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@ekim. N716	Marmara	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@ekim. N766	Marmara	SSSS	13
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD109	Ege	SRSS	10
	G@TBC-IS6110@82-. ZD93	Marmara	SRSS	13
	G@TBC-IS6110@B-0. TK020	Malatya	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-0. TK027	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK012	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-fr. N217	Malatya	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD138	Marmara	SSSR	6
	G@TBC-IS6110@B-fr. N4	Malatya	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@01.0. N273	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-fr. N89	Malatya	RRSR	9
	G@TBC-IS6110@30.0. N179	Malatya	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@ekim. N803	Malatya	RSSS	6
	G@TBC-IS6110@11.0. N479	Akdeniz	RSSS	6
	G@TBC-IS6110@B-fr. N288	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@B-fr. N160	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@ekim. N782	Akdeniz	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-fr. N91	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-fr. N94	Malatya	RSSS	9
	G@TBC-IS6110@ekim. N688	Marmara	SSRS	11
	G@TBC-IS6110@ekim. N726	Marmara	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD121	Ege	RRRR	11
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD113	Ege	RRRS	11
	G@TBC-IS6110@B-0. TK005	Malatya	RSSS	11
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD132	Marmara	RRSS	10
	G@TBC-IS6110@B-fr. N85	Malatya	SSSS	13
	G@TBC-IS6110@82-. ZD86	Marmara	RRRR	12
	G@TBC-IS6110@66-. ZD81	Ege	RRRR	16
	G@TBC-IS6110@66-. ZD66	Akdeniz	RRSR	10
	G@TBC-IS6110@02.0. N241	Malatya	SSSS	13
	G@TBC-IS6110@1-1. ZD16	Marmara	RRRR	11
	G@TBC-IS6110@ekim. N751	Akdeniz	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD105	Ege	RRSS	10
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD104	Ege	RRRS	9
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD114	Ege	RRRR	8
	G@TBC-IS6110@48-. ZD48	Marmara	RRSR	11
	G@TBC-IS6110@01.0. N290	Malatya	RRRR	10
	G@TBC-IS6110@ekim. N771	Ege	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@ekim. N693	Marmara	RSSS	8
	G@TBC-IS6110@ekim. N753	Marmara	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-0. TK063	Malatya	SSRS	7
	G@TBC-IS6110@B-0. TK068	Malatya	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@B-0. TK054	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK023	Malatya	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@B-0. TK036	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@ekim. N740	Marmara	RSRS	7
	G@TBC-IS6110@B-0. TK060	Malatya	SSSS	15
	G@TBC-IS6110@B-0. TK078	Malatya	SSSS	15
	G@TBC-IS6110@ekim. N775	Ege	SSSS	14
	G@TBC-IS6110@B-0. TK070	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@B-0. TK064	Malatya	RRRR	10
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD131	Marmara	RRRS	9
	G@TBC-IS6110@ekim. N708	Marmara	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD129	Marmara	RRRS	12
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD126	Marmara	RRRS	12

	G@TBC-IS6110@ekim.N700	Marmara	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD129	Marmara	RRRS	12
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD130	Marmara	RRRS	12
	G@TBC-IS6110@ekim.N651	Akdeniz	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@B-0. TK038	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-0. TK008	Malatya	RSRS	9
	G@TBC-IS6110@B-fr. N84	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@B-fr. N28	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@ekim.N805	Malatya	RSSS	11
	G@TBC-IS6110@ekim.N707	Marmara	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@B-0. TK015	Malatya	RSSS	15
	G@TBC-IS6110@03.0. N181	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@03.0. N551	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@03.0. N171	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@03.0. N257	Malatya	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@03.0. N315	Malatya	RRSS	10
	G@TBC-IS6110@03.0. N242	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@66-. ZD77	Marmara	RRSS	6
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD118	Ege	RRRR	10
	G@TBC-IS6110@B-0. TK073	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD137	Marmara	RSSS	6
	G@TBC-IS6110@B-0. TK035	Malatya	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@11.0. N442	Marmara	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@B-0. TK051	Malatya	RSSS	5
	G@TBC-IS6110@tbc-. N289	Malatya	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@66-. ZD76	Marmara	RRRR	7
	G@TBC-IS6110@B-0. TK039	Malatya	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@82-. ZD84	Ege	SRSS	7
	G@TBC-IS6110@33-. ZD44	Ege	RRRS	7
	G@TBC-IS6110@03.0. N185	Malatya	RSSS	9
	G@TBC-IS6110@02.0. N96	Akdeniz	SSSS	9
	G@TBC-IS6110@17-. ZD26	Marmara	SRSS	11
	G@TBC-IS6110@11.0. N483	Akdeniz	SSSS	10
	G@TBC-IS6110@B-bi. ZD100	Ege	RRSS	11
	G@TBC-IS6110@01.0. N920	Marmara	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@1-1. ZD10	Marmara	RRSS	10
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD134	Marmara	RSRS	8
	G@TBC-IS6110@B-fr. N259	Malatya	SSSS	11
	G@TBC-IS6110@ekim.N727	Marmara	SSSS	12
	G@TBC-IS6110@17-. ZD27	Marmara	RRSR	12
	G@TBC-IS6110@03.0. N170	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@03.0. N243	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@30.0. N232	Malatya	SSSS	8
	G@TBC-IS6110@B-0. TK052	Malatya	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@B-0. TK057	Malatya	SSRR	7
	G@TBC-IS6110@B-0. TK077	Malatya	SSSS	7
	G@TBC-IS6110@B-0. TK003	Malatya	SSSS	6
	G@TBC-IS6110@B-fr. N153	Malatya	SSSS	6
	G@TBC-IS6110@B-fr. N34	Malatya	SSSS	6
	G@TBC-IS6110@B-fr. N80	Malatya	SSSS	6
	G@TBC-IS6110@B-fr. ZD166	Akdeniz	RRRS	6
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD146	Akdeniz	RRRR	6
	G@TBC-IS6110@tbc-. ZD149	Akdeniz	RRRS	6
	G@TBC-IS6110@48-. ZD50	Marmara	RRSS	7
	G@TBC-IS6110@B-fr. N11	Malatya	SRSS	7
	G@TBC-IS6110@11.0. N430	Marmara	SSSS	5
	G@TBC-IS6110@1-1. ZD11	Marmara	RRSS	8

G@TBC-IS6110@11.0. N430	Marmara	SSSS	5
G@TBC-IS6110@1-1. ZD11	Marmara	RRSS	8
G@TBC-IS6110@17-. ZD17	Ege	RRSR	9
G@TBC-IS6110@B-0. TK032	Malatya	SSSS	7
G@TBC-IS6110@B-0. TK016	Malatya	SSSS	7
G@TBC-IS6110@B-0. TK017	Malatya	SSSR	7
G@TBC-IS6110@B-0. TK080	Malatya	SSSS	7
G@TBC-IS6110@ekim. N705	Marmara	SSSS	7
G@TBC-IS6110@ekim. N809	Malatya	SSSS	7
G@TBC-IS6110@66-. ZD75	Ege	RSSS	8
G@TBC-IS6110@B-0. TK045	Malatya	SSSS	5
G@TBC-IS6110@30.0. N309	Malatya	SSSS	6
G@TBC-IS6110@B-0. TK084	Malatya	SSSS	4
G@TBC-IS6110@ekim. N734	Marmara	RRRR	6
G@TBC-IS6110@02.0. N186	Malatya	SSSS	7
G@TBC-IS6110@tbc-. ZD148	Akdeniz	RRSS	4
G@TBC-IS6110@ekim. N718	Marmara	SSSS	6
G@TBC-IS6110@ekim. N763	Marmara	SSSS	5
G@TBC-IS6110@B-fr. N10	Malatya	SSRS	4
G@TBC-IS6110@1-1. ZD9	Akdeniz	RSSS	4
G@TBC-IS6110@66-. ZD69	Akdeniz	RSRS	4
G@TBC-IS6110@ekim. N648	Akdeniz	RSRS	4
G@TBC-IS6110@1-1. ZD3	Marmara	RRSS	4
G@TBC-IS6110@ekim. N735	Marmara	RRSS	4
G@TBC-IS6110@ekim. N714	Marmara	SSSS	4
G@TBC-IS6110@tbc-. ZD126	Marmara	RRRR	4
G@TBC-IS6110@33-. ZD40	Ege	RSRS	4
G@TBC-IS6110@B-bi. ZD103	Ege	RRRS	4
G@TBC-IS6110@B-bi. ZD107	Ege	RRRS	4
G@TBC-IS6110@48-. ZD57	Akdeniz	RSRS	4
G@TBC-IS6110@B-fr. ZD165	Akdeniz	RRRS	4
G@TBC-IS6110@B-fr. ZD156	Akdeniz	RRRR	4
G@TBC-IS6110@tbc-. ZD147	Akdeniz	RRRR	4
G@TBC-IS6110@tbc-. ZD151	Akdeniz	RRSS	4
G@TBC-IS6110@82-. ZD90	Marmara	RRRR	5
G@TBC-IS6110@17-. ZD19	Marmara	RRSS	2
G@TBC-IS6110@17-. ZD30	Marmara	SRSS	2
G@TBC-IS6110@33-. ZD36	Marmara	RRRR	2
G@TBC-IS6110@33-. ZD37	Marmara	RRRS	2
G@TBC-IS6110@82-. ZD83	Marmara	RRRS	2
G@TBC-IS6110@82-. ZD89	Marmara	RRR?	2
G@TBC-IS6110@B-0. TK028	Malatya	SRSS	2
G@TBC-IS6110@B-0. TK009	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@B-0. TK022	Malatya	RRSS	2
G@TBC-IS6110@B-0. TK033	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@B-0. TK037	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@B-0. TK066	Malatya	SSRS	2
G@TBC-IS6110@B-0. TK082	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@B-fr. N44	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@B-fr. N154	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@B-fr. N16	Malatya	SSRS	2
G@TBC-IS6110@B-fr. N45	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@B-fr. N271	Malatya	SSRS	2
G@TBC-IS6110@B-fr. N49	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@B-fr. TK006	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@ekim. N719	Marmara	SSSS	2



G@TBC-IS6110@B-fr. TK006	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@ekim.N719	Marmara	SSSS	2
G@TBC-IS6110@ekim.N768	Marmara	SSSS	2
G@TBC-IS6110@ekim.N790	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@ekim.N695	Marmara	SSRS	2
G@TBC-IS6110@ekim.N813	Malatya	SSSS	2
G@TBC-IS6110@tbc-. ZD124	Marmara	RRRR	2
G@TBC-IS6110@tbc-. ZD141	Marmara	RRRS	2
G@TBC-IS6110@17-. ZD22	Ege	RRRS	2
G@TBC-IS6110@B-bi. ZD97	Ege	RRRS	2
G@TBC-IS6110@B-bi. ZD112	Ege	RRRS	2
G@TBC-IS6110@B-bi. ZD111	Ege	RRRS	2
G@TBC-IS6110@B-bi. ZD116	Ege	SRSS	2
G@TBC-IS6110@17-. ZD23	Akdeniz	RSSS	2
G@TBC-IS6110@17-. ZD25	Akdeniz	RRRS	2
G@TBC-IS6110@B-fr. ZD160	Akdeniz	RSSS	2
G@TBC-IS6110@ekim.N742	Akdeniz	RRSR	2
G@TBC-IS6110@B-0. TK062	Malatya	SSSS	3
G@TBC-IS6110@48-. ZD54	Marmara	RR?S	3
G@TBC-IS6110@B-0. TK025	Malatya	SSSS	3
G@TBC-IS6110@B-0. TK018	Malatya	RSSS	3
G@TBC-IS6110@ekim.N697	Marmara	SSSS	3
G@TBC-IS6110@B-fr. TK049	Malatya	RSSS	3
G@TBC-IS6110@48-. ZD53	Akdeniz	RSSR	4
G@TBC-IS6110@tbc-. ZD125	Marmara	RRRR	3
G@TBC-IS6110@48-. ZD65	Ege	SSRR	3
G@TBC-IS6110@33-. ZD38	Akdeniz	RSRS	3
G@TBC-IS6110@66-. ZD68	Marmara	RRSR	4
G@TBC-IS6110@ekim.N746	Marmara	SSSS	3
G@TBC-IS6110@33-. ZD35	Akdeniz	RSSS	4
G@TBC-IS6110@ekim.N721	Marmara	SSSS	4
G@TBC-IS6110@ekim.N712	Marmara	SSSS	4
G@TBC-IS6110@ekim.N687	Marmara	SSSS	3
G@TBC-IS6110@B-fr. N2	Malatya	SSSS	3
G@TBC-IS6110@B-fr. N30	Malatya	SSSS	3
G@TBC-IS6110@B-0. TK072	Malatya	SSRS	4
G@TBC-IS6110@B-0. TK085	Malatya	SSRS	4
G@TBC-IS6110@B-fr. N503	Malatya	SSSS	4
G@TBC-IS6110@B-0. TK065	Malatya	SSRS	5
G@TBC-IS6110@33-. ZD46	Marmara	RRRS	4
G@TBC-IS6110@33-. ZD47	Marmara	RRRS	5
G@TBC-IS6110@ekim.N722	Marmara	SSSS	3
G@TBC-IS6110@tbc-. ZD153	Akdeniz	RRSS	3
G@TBC-IS6110@ekim.N770	Ege	SSSS	3
G@TBC-IS6110@1-1. ZD8	Ege	RRRR	5
G@TBC-IS6110@82-. ZD96	Ege	RSSS	5
G@TBC-IS6110@B-bi. ZD108	Ege	RRSS	5
G@TBC-IS6110@12.0. N970	Malatya	RSSS	4
G@TBC-IS6110@82-. ZD94	Marmara	RRRR	4
G@TBC-IS6110@1-1. ZD12	Marmara	RRSS	4
G@TBC-IS6110@ekim.N739	Marmara	RRSS	4
G@TBC-IS6110@11.0. N440	Marmara	RSSS	6
G@TBC-IS6110@B-0. TK029	Malatya	SRSS	7
G@TBC-IS6110@B-fr. N83	Malatya	SSSS	5
G@TBC-IS6110@B-0. TK083	Malatya	RSSS	5
G@TBC-IS6110@B-fr. N88	Malatya	RSSS	5
G@TBC-IS6110@B-fr. N9	Malatya	RSSS	5



Şekil 8. 450 *Mycobacterium tuberculosis* suşunun GelComparII software (version 3.5 Applied Math, Ghent, Belgium) programı kullanılarak yapılan dendrogram sonuçları.

IS6110 kopya sayısı 2-16 arasında değişiklik göstermekte ve küme içinde bulunan suş aralığı 2-36 dır. Bir kopya IS6110 bulunduran ve hiç bulundurmeyen suş saptanmamıştır. Tablo 2’de IS6110 kopya sayısına göre kümeleşme oranı verilmiştir.

Tablo 2. IS6110 kopya sayısına göre kümeleşme oranı

IS6110 KOPYA SAYISI	KÜME SAYISI	KÜME OLUŞTURAN SUŞ SAYISI (%)
2 (n=42)	3	42 (100)
3 (n=28)	7	21 (75)
4 (n=33)	6	24 (72.7)
5 (n=26)	3	9 (34.6)
6 (n=23)	3	11 (47.8)
7 (n=47)	9	30 (63.8)
8 (n=60)	5	16 (26.6)
9 (n=57)	4	9 (15.8)
10 (n=49)	7	17 (34.6)
11 (n=41)	5	12 (29.2)
12 (n=21)	3	8 (38)
13 (n=11)	-	-
14 (n=7)	1	2 (28.5)
15 (n=4)	1	2 (50)
16 (n=1)	-	-
TOPLAM (n=450)	57	203

IS6110 kopya sayısı 5 ve altında olan (düşük kopya sayılı) suş sayısı 129 (%28.6) dur. Bölgelere göre düşük kopya sayılı suşların dağılımı Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Düşük kopya sayılı suşların bölgelere göre dağılımı

BÖLGELER	SUŞ SAYISI	YÜZDESİ
MALATYA	56	56/200 (%28.0)
MARMARA	40	40/150 (%26.6)
AKDENİZ	18	18/50 (%36.0)
EGE	15	15/50 (%30.0)
TOPLAM	129	129/450 (% 28.6)

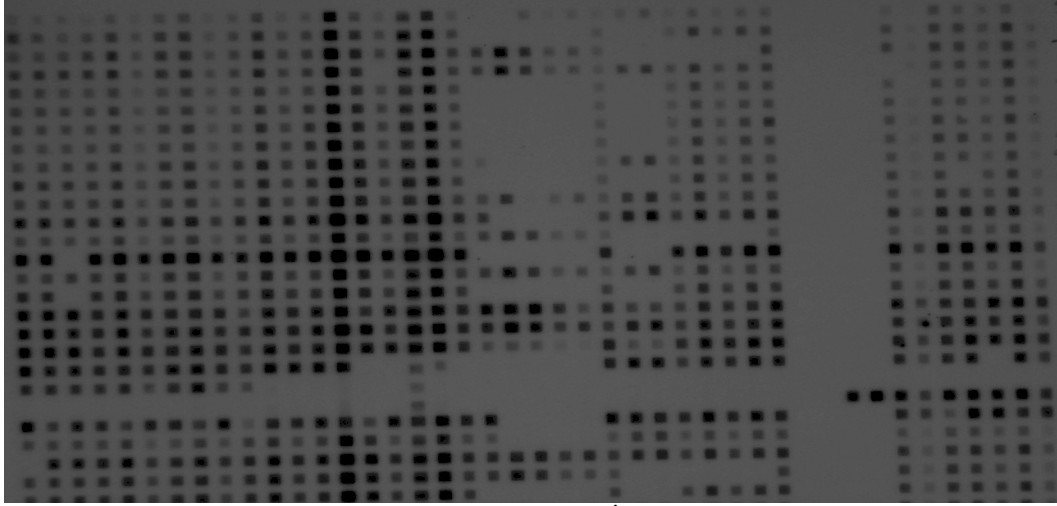
Spoligotipleme ile 113 farklı patern belirlendi. Kırk yedi küme içinde 384 (%85.3) suş yer alırken, 66 (%14.7) suş özgü profil gösterdi. Çalışmaya alınan 450 suşa ait hibridizasyon ve oktal kod profilleri ile paylaşılan tip (PT) numaraları ve duyarlılık sonuçları Tablo 4’de gösterilmiştir. Özgü profil gösteren suşlardan 49 (%10.9) tanesi SpolDB4 veri bankasındaki suşlarla karşılaştırıldığında hiçbir suşla küme oluşturmadı (yalnız suş). Familiaları tespit edilemeyen bu suşlara ait hibridizasyon ve oktal kod profilleri Tablo 5’de verilmiştir. Dünyanın birçok ülkesine ait 45.000 suşun incelenmesi ile elde edilen ve 1939 farklı spoligotip profiline sahip SpolDB4 veri bankasındaki suşlarla eşleşmeyen ancak kendi aralarında 4 küme oluşturan 14 suşa ait bilgiler Tablo 6’da görülmektedir.

Tablo 4. Bu çalışmadaki 450 suşun spoligotipleme sonuçları ve SpolDB4 veri bankasına göre değerlendirilmeleri

No	Örnek No	Hibridizasyon profili	Oktal Kod	PT	Direnç Profili	Familya
1	TK001	●●●●●●□□●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●	774777777420771	262	ÇİD DEĞİL	H4
2	TK002	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●	777767770000000	1656	ÇİD DEĞİL	U
3	TK003	□□□□●●●●□□●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●	03763777760771	284	DUYARLI	T1
4	TK004	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●	77777777760771	53	DUYARLI	T1
5	TK005	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●	77637777760771	34	ÇİD DEĞİL	S
6	TK006	●●●●●●●●●●●●●●●●□□□□□□●●●●●●●●●●●●	777777404760771	41	DUYARLI	LAM7TUR
7	TK007	●●□□●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●	677777607160771	1791	DUYARLI	LAM1
8	TK008	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	00000004020771	2	ÇİD DEĞİL	H2
9	TK009	●●●●●●●●●●●●●●●●□□□□□□●●●●●●●●●●●●	777777404760771	41	DUYARLI	LAM7TUR
10	TK010	●●●●●●●●●●●●●●●●□□□□□□●●●●●●●●●●●●	777777404760771	41	ÇİD DEĞİL	LAM7TUR
11	TK011	●●●□□□□□□●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●	70037777760771	Yeni	ÇİD DEĞİL	Bilinmeyen

14	N441	77737777760601	Yeni	ÇİD DEĞİL	Bilinmeyen
----	------	-------	----------------	------	-----------	------------

En sık rastlanan spoligotip kümeleri sırasıyla, PT41 (87/450) % 19.3, PT 53 (85/450) % 18.8, PT47 (20/450) % 4.4, PT50 (18/450) % 4, PT284 (18/450) % 4, PT196 (10/450) % 2.2. Suşlara ait örnek bir membran Şekil 9'da verilmiştir. Tablo 7'de majör PT'lerin bölgelere göre dağılımı görülmektedir. Majör PT'lerin bölgelere göre dağılımında önemli bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 9. Spoligotiplendirme yöntemine ait örnek bir membran. İlk sıra H37Rv; 2, 5-10 örnekler LAM77TUR; 18,19 T1; 22. örnekte tipik profil gösteren Beijing suşu. 21. sıra negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 7. Majör paylaşılan tiplerin (PT) bölgelere göre dağılımı.

PAYLAŞILAN TİP (N)	BÖLGELER			
	MALATYA (n=200)	MARMARA (n=150)	AKDENİZ (n=50)	EGE (n=50)
PT 41 (87)	37	27	14	9
PT 53 (85)	43	23	11	8
PT47 (20)	4	9	6	1
PT 50 (18)	7	7	-	4
PT 284 (18)	8	4	3	3
PT 196 (10)	5	1	1	3
PT 4 (10)	4	5	-	1
PT 62 (9)	7	2	-	-
PT1261 (9)	2	4	2	1
YALNIZ (49)	18	19	5	7

Çalışmamızda en sık rastlanan üç aileye geçici tanımlanmış T süper ailesi (174/450) %38.6, LAM (123/450) %27.3 ve Haarlem (67/450) %14.8 olarak belirlenmiştir. Ayrıca Hindistan bölgesine özgü olan CAS1-Delhi ailesinden 2 suş (2/450) %0.44 ve

çoğul ilaç direnciyle ilişkili olan Beijing/W familyasına ait de 4 suş (4/450) %0.9 tespit edildi. Diğer familyalar ve görülme sıklıkları Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. 450 suşa ait familyalar ve görülme sıklığı.

FAMİLYALAR	GÖRÜLME SIKLIĞI (N)
Beijing	4
Cas1-Delhi	2
Haarlem	67
LAM	123
S	19
T	174
U	8
X	4
BİLİNMEYEN	49
TOPLAM	450

Dört coğrafik bölgeye özgü majör bir spoligotip profili bulunmamıştır. On dokuz S familyasının %68.5’i duyarlı, %31.5’ de dirençli suşlardan oluşurken geçici tanımlanmış T süper familyası, Haarlem ve familyası bilinmeyen grupta duyarlı dirençli suş dağılımı yaklaşık yarıyarıya bulunmuştur. LAM familyasında ise %61.8 oranında dirençli suşlar baskın durumdadır. Dört Beijing genotipinin hepsi çoğul ilaç dirençli bulundu. Duyarlı, dirençli ve çoğul dirençli suşlardaki spoligotip familyaları Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9.Duyarlı, dirençli ve çoğul dirençli suşlardaki spoligotip familyaları

FAMİLYALAR	DUYARLI	DİRENÇLİ	ÇOĞUL DİRENÇLİ
S (n=19)	13 (%68.5)	4 (%21)	2 (%10.5)
T (n=174)	84 (%48.3)	30 (%17.2)	60 (%34.5)
U (n=8)	2 (%25)	4 (%50)	2 (%25)
BEIJING (n=4)	-	-	4 (%100)
LAM (n=123)	47 (%38.2)	44 (%35.8)	32 (%26)
HAARLEM (n=67)	36 (%53.8)	20 (%29.8)	11 (%16.4)
CAS1-Delhi (n=2)	1 (%50)	1 (%50)	-
X (n=4)	3 (%75)	1 (%25)	-
BİLİNMEYEN (n=49)	21 (%42.9)	16 (%32.7)	12 (%24.4)
TOPLAM (n=450)	207	120	123

Her iki tiplleme yönteminin birlikte kullanılmasıyla 299 farklı patern elde edildi. İkiyüz on dokuz suşun dahil olduğu 68 (%48.7) küme tanımlandı, 231 (% 51.3) suş özgü bulundu. Tablo 10'da yöntemlerin tek tek ve birlikte değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar verilmektedir. IS6110 profili benzer olan 72 suş ile kopya sayısı $5 \leq$ olan 96 suşun (IS6110 ile küme içinde bulunan) spoligotiplleme sonuçlarına göre değerlendirilmesiyle IS6110 profili benzer olan 72 suştan 39 tanesi küme, 33 tanesi de özgü olarak belirlendi. IS6110 ile küme içinde bulunan 96 düşük kopya sayılı suşdan 73'ü küme, 23'ü de özgü olarak tespit edildi.

Tablo 10. Moleküler tiplleme yöntemlerin tek tek ve birlikte değerlendirilme sonuçları.

	ÖZGÜ PROFİL	BENZER PROFİL	KÜME OLUŞTURANLAR KÜME SAYISI/KÜME İÇİNDEKİ SUŞ SAYISI (%)	TOPLAM PROFİL SAYISI
IS6110 RFLP	175 (%38.9)	72 (%16)	57 203 (45.1)	304
SPOLİGOTİPLEME	66 (%14.7)	-	47 384 (85.3)	113
IS6110 RFLP + SPOLİGOTİPLEME	231	-	68 219 (48.7)	299

TARTIŞMA

Tarihin her döneminde insan sağlığını tehdit eden ve günümüzde de önemini koruyan tüberkülozla etkin bir mücadele için hızlı ve duyarlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi kadar, epidemiyolojik verilerin alınacağı popülasyon genetiği çalışmalarına da ihtiyaç vardır (1). Son yirmi yılda, moleküler epidemiyoloji, araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (54).

Moleküler tekniklerin geliştirilmesi ile infeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinin anlaşılması konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (37). Moleküler tiplendirme tüberkülozun; bulaş ile risk faktörleri arasındaki ilişkinin açıklanmasında, dirençli suşların yayılımlarının belirlenmesinde, farklı suşlardaki virulans ve direnç mekanizmalarının aydınlatılmasında, salgınların belirlenmesinde, filogenetik özelliklerinin ve yayılma dinamiklerinin tespitinde, reenfeksiyonun reaktivasyondan ayırımında ve laboratuvar kontaminasyonlarının gösterilmesinde son derece yararlı olmuştur (36).

Ülkemiz bir tarafta Batı Avrupa gibi düşük tüberküloz insidansına sahip ülkelerle komşuyken, diğer taraftan da Eski Sovyetler Birliği ve Asya ülkeleri gibi yüksek insidansa sahip bir coğrafyada bulunmaktadır (4). Hızlı nüfus artışı ve kırsal alandan büyük şehirlere göçün devam ettiği ülkemizde tüberkülozla etkin bir mücadele için izole edilen tüm suşların moleküler epidemiyolojik bilgilerinin çıkarılması kaçınılmazdır.

Tüberkülozun moleküler tiplendirilmesinde çok sayıda yöntem geliştirilmiş olmasına rağmen hiç biri tek başına yeterli ayırım gücü sağlayamamıştır. Bu sorunu ortadan kaldırmak için sistemlerin birlikte kullanılması tercih edilmiştir. Birinci metot ile grup oluşturan suşlar belirlenmekte, ikinci yöntemle grup içinde bulunan suşların doğrulaması yapılmaktadır (36). Bizde bu çalışmada IS6110 RFLP ve Spoligotipleme yöntemlerini birlikte kullanarak Türkiye'nin dört farklı coğrafik bölgesine ait 450 *Mycobacterium tuberculosis* izolatının moleküler tiplendirmesini yaptık.

Epidemiyolojik ve demografik verilerini toplayabildiğimiz ilimizdeki hastaların genel değerlendirmesi yapıldığında; Malatya'da tüberküloz vakası kadınlara göre erkeklerde 1.4 kat daha fazla görülmektedir. Durmaz ve ark. (7,8) yaptığı çalışmada bu oran ortalama 2.5 olarak hesaplanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri, İsviçre, Hollanda, Ekvator, İran, Türkmenistan ve Özbekistan'da yapılan çalışmalarda ortalama 1.6 olarak tespit edilmiş (55-61).

Tüberküloz basilleri üzerine yapılacak olan araştırmalarda üzerinde durulması gereken hususlardan biri, izolatların anti-tüberküloz ilaçlara direnç profillerinin bilinmesidir. Bu çalışmada kullanılan suşların %46'sı (207/450) test edilen dört majör ilaçlara duyarlı, %22'si (99/450) tek bir ilaca dirençli, %27.3' (123/450) İD ve %4.7'si (21/450) iki veya daha fazla ilaca dirençliydi. Malatya dışındaki bölgelerden alınan suşların direnç verileri o toplumlardaki gerçek durumu yansıtmayabilir. Çünkü bu tezin temel amacı, farklı bölgelerdeki dirençli suşlar arasındaki klonal ilişkiyi irdelemek olduğundan, Malatya dışındaki suşların seçiminde özellikle dirençli suşlar tercih edilmiştir. Malatya'dan izole edilen suşların %64.5'i (129/200) dört majör ilaçlara duyarlı, % 6.5'i (13/200) İD ve %29'u (58/200) bir veya daha fazla ilaca dirençli bulundu. Bu oranlar ilimizde yapılmış olan diğer çalışmalarla kıyaslandığında, Durmaz ve ark. tarafından 2000 yılında yapılan çalışmada incelenen 88 suşun %67'si duyarlı, %30.8'i bir veya daha fazla ilaca direnliyken, %2.2 oranında İD tespit edilmiştir (6). İD oranındaki uyumsuzluk; Durmaz ve ark. yaptığı çalışmada primer ilaç direnci bakılırken, bu çalışmada primer ve sekonder direncin birlikte değerlendirilmesinden kaynaklanmış olabilir.

İstanbul bölge tüberküloz laboratuvarında yapılan ilaç direnç çalışmalarının sonuçları incelendiğinde; yeni olgulardan üretilmiş suşlarda en az bir ilaca direnç %14, tedavi almış hastalardan üretilmiş olanlarda %34.3 olarak bulunmuştur. Bu gruplardaki İD oranları sırasıyla %4.3 ve %17.1 olduğu grlmştir (30). Türkiye'nin her bölgesinden g alan İstanbul'dan 1865 suşa ait bu sonuçlar ülke genelini temsil etmesi bakımından oldukça önemlidir.

Gencer ve ark. altı ilden (Ankara, Antalya, Kayseri, Trabzon, Samsun, Van) toplanan 381 suş üzerinde yaptıkları benzer çalışmada; bir veya daha fazla ilaca direnç %23, İD oranı %4.4 olarak tespit edilmiştir (62).

Öztürk ve ark. tarafından Düzce'de 62 *M. tuberculosis* izolatının majör ilaçlara direnç profillerinin değerlendirildiği çalışmada duyarlı, bir veya daha fazla ilaca dirençli ve İD oranları sırasıyla %83.8, %11.4 ve %4.8 olarak bulunmuştur (63).

Bengisun ve ark. tarafından Ankara'da yapılan ve 21 yıllık (1976-1997) bir dönemi kapsayan retrospektif çalışmanın sonuçlarına bakıldığında; duyarlı suşların oranı %60.8, en az bir ilaca direnç %33.4 ve İD %5.8 olduğu görülmektedir (64).

Ege bölgesinde 1999 ve 2001 yıllarındaki direnç oranlarının değerlendirildiği retrospektif bir çalışmada: duyarlı suşların oranları %76, %85; en az bir ilaca dirençli olanlar %17.4, %9.2; ve İD olanlar % 6.6, %5.8 olarak hesaplanmış (65).

Genel olarak duyarlılık test sonuçları çalışılan hasta gruplarına ve kullanılan yöntemlere göre önemli değişiklikler göstermektedir. Bölgemiz izolatlarına ait direnç profili ülkemizdeki suşların direnç profilleriyle benzerlik göstermiştir.

Avrupa ülkelerindeki durumu yansıtan ve Euro TB grubu tarafından 2003 yılında yapılan çok merkezli çalışmada Batı ve Orta Avrupa'da ÇİD vaka oranı %1.7 düzeyindeyken, Baltık ülkelerinde bu oran %19.5 gibi çok yüksek değerlerde bulunmuştur. Ayrıca dikkat çekici olarak ÇİD TB görülen vakaların %80'nin Avrupa dışında doğmuş kişilerde görülmesi ve bunlar içinde de Eski Sovyet ülkesi vatandaşlarının oranının %24 olmasıdır (66).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2003 yılı için tahmini ÇİD-TB oranları; yeni vakalarda %2.6, tedavi almışlarda %21.8 olarak açıklanırken, dünyada en fazla ÇİD-TB görülen bölgelerin de Doğu Avrupa, Güney Doğu Asya ve Batı Pasifik olduğu açıklanmıştır (30).

Bölgemize yakın ülkelerden İran da yapılan çalışmada; duyarlı, dirençli ve ÇİD oranları sırasıyla %77, %21 ve %2 olarak hesaplanmış (67). Dünyada primer ÇİD oranının en yüksek olduğu Kazakistan'a komşu Özbekistan ve Türkmenistan'da yapılan çalışmada izolatların sadece % 38'i majör ilaçlara duyarlı bulunmuş, ÇİD-TB olgularının %75'ninin Beijing suşu ile ilişkili olduğu tespit edilmiş (58). NewYork şehrinde iki yıllık periyotta izole edilen 4955 suşun %96'sı duyarlı, %4'ü ÇİD olarak bulunmuştur (68).

Ülkemizde ve dünya da yapılan diğer çalışmaları birlikte değerlendirdiğimizde ülkemizdeki direnç oranları Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerindeki kadar yüksek, Eski Sovyet Ülkeleri, Baltık Devletleri ve Doğu Asya Ülkelerine oranla da düşük bulunmuştur.

Tüberkülozla mücadelede başarılı olmuş olan ülkeler etkenin kısa sürede saptanması, etkin tedavi için elzem olan kökenlerin in vitro direnç durumunu belirleyerek olabilecek en uygun ilaç kombinasyonu ile tedavinin başlatılması ve sürdürülmesi yanında, kontrol önlemleri açısından da önemli mesafeler almışlardır. Birçok Batı Avrupa ülkesi ve Amerika Birleşik Devletleri'nde tüberkülozun epidemiyolojisi, korunma ve kontrol önlemlerine önemli katkılar sağlamakta olan moleküler tipleme çalışmalarına uzun süre önce başlanmış ve halen yaygın olarak yapılmaktadır. Ülkemizde de bu çalışmalara geç de olsa başlanmış, yapılan çalışmalarla ülkemizdeki kökenlerin klonal ilişkisine yönelik önemli bilgiler alınmıştır (6, 40, 62). Tüberküloz insidansının yüksek olduğu ülkemizde bu konuda yapılacak olan çalışmalar ihtiyaç vardır.

Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan 450 suşun IS6110 RFLP analizinin yapıldığı bu çalışmada 304 farklı patern elde edilmiştir. Kümeleşme oranı

%45.1, özgü profil %38.9 ve benzer profil oluşturma oranı %16 olarak bulunmuştur. İzolatların %28.6'sı düşük kopyalı suş, 5 kopyanın altında IS6110 bulundurmakta, olarak tanımlandı. Bu sonuçlara göre tek başına IS6110 RFLP kullanıldığı zaman çalışmada kullanılan suşların yaklaşık %45'ı tiplendirilememektedir. Çünkü IS6110 RFLP yöntemi kopya sayısı düşük olan suşlar ile IS6110 RFLP profili benzer olanlarını ayırmasını yapamamaktadır (44,45). Ankara'da yapılan bir çalışmada 368 suştan 232'si küme içinde (%63) yer alırken, düşük kopya sayılı suşların oranı %27.7, iki adet IS6110 kopyası taşıyan suş oranı da %10 olarak saptanmıştır (62). Malatya'da daha önce yapılan çalışmalarda; düşük kopya sayılı suşların oranı %25.3 ve %26 olarak belirlenmiştir (7,8).

Kerry H. Lok ve ark. tarafından Alabama'da gerçekleştirilen araştırmada düşük kopyalı suşların oranının %41 olduğu ve bunların içinde 2 kopyalı olanların %14'ü oluşturduğu belirlenmiştir (14). İran'da 105 suşla yapılan çalışmada düşük kopyalı suşların oranı bizim ve diğer araştırmacıların verilerine göre oldukça düşük (%8.6) bulunmuştur (67).

Heldal E. ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da beş ve daha az IS6110 kopyası taşıyan suşların oranını %11.2 olarak bulmuşlardır. Norveç'te yapılan bu araştırmada Avrupa Ülkesi doğumlu olanlara göre Asya ve Afrika doğumlu olanlarda kopya sayısı yönünden anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (69).

IS6110 RFLP'nin Spoligotipleme ile birlikte değerlendirilmesiyle kümeleşme oranımız beklenmedik bir biçimde %45.1'den %48.7 çıkmıştır. Aslında ikinci tipleme yöntemi olarak kullanılan spoligotiplemeden beklenen, düşük sayıda IS6110 kopyası bulundurmaları nedeniyle IS6110 RFLP yöntemiyle hatalı olarak küme içinde değerlendirilmiş olan suşların, ilave ayrımlarını yapması ve böylece kümeleşme oranını düşürmesidir. Ancak; beklenenin aksine kümeleşme oranını artırmıştır. Bu durum, daha önce belirtilmiş olanın (44) aksine, kökenler arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi belirlemede ikinci tipleme yöntemi olarak spoligotipleme yöntemini kullanmanın yararlı olmadığını göstermektedir. Son gelişmelerde Spoligotipleme'yi moleküler tiplemede kullanmak yerine, kökenler arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemede kullanmaya yönelmektedir (70).

Bölgelere göre kümeleşme oranlarımız; Malatya'da %54, Marmara'da %42.6, Akdeniz'de %52 ve Ege Bölgesi'nde %42 olarak hesaplandı. Ülkemizde; Gencer ve ark. tarafından her iki yöntem kullanılarak yapılan benzer bir çalışmada kümeleşme oranı %37 olarak bulunmuştur (62).

Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda kümeleşme oranları Hollanda ve Danimarka da %50, Norveç'te %20 ve ABD'de %48 olarak belirlenmiştir (66,71-73). İran'da klonal ilişki bizdekine yakın olarak (%43) bulunmuştur (57).

IS6110 RFLP ve Spoligotiplleme yöntemlerini birlikte kullanarak IS6110 RFLP ile bir bant farklılığı nedeniyle benzer bulunan ve kopya sayısı 5 ve altında olan suşlar için ilave bir tiplendirme amaçlanırken, ayrıca spoligotiplleme yöntemine göre aynı profili paylaşan tipler (PT) ve major spoligotip familyaları belirlenerek, bir suşun filogenetik yayılımı hakkında fikir yürütülebilmektedir. Dünya'nın birçok ülkesinden yapılan çalışmalarla dünyanın her tarafında görülen ya da belirli bir coğrafik bölgeye özgü familyalar belirlenmiş ve bunlar uluslar arası veri bankasında toplanmıştır. Bu veri tabanı uluslar arası kullanıma açılarak, dünyanın neresinden olursa olsun yapılan tiplleme sonuçları bu veri bankasındakilerle kıyaslanarak, çalışılan *M. tuberculosis* izolatlarının familyaları ve PT'lerinin belirlenmesi gerçekleştirilebilmiştir (48,74,75).

Spoligotiplleme ile incelemeye alınan 450 suş arasından 113 farklı profil elde edildi. Bu yöntemle göre suşların oldukça büyük bir yüzdesi (%85.3) küme içinde tanımlanmıştır. Malatya'da daha önce yapılan bir çalışmada kümeleşme oranı %66.7 olarak bulunmuştur (74). Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada da kümeleşme oranını %77 bulmuşlardır (62). Güney Afrika'da yapılan bir çalışmada ise %77 oranında kümeleşme saptanmıştır (76). İtalya'da 282 *M. tuberculosis* izolatı üzerinde yapılan tiplendirme sonucunda kümeleşme oranı %65.9, Danimarka'da %57 olarak bulunmuştur (77,78). Komşu ülkelerde yapılan çalışmalarda; Rusya'da %68.1, İran'da %74.4 gibi sonuçlar alınırken, Amerika Birleşik Devletlerinde bu ülke doğumlu olanlarla, göçmen popülasyonunun yoğunluğuna bağlı olarak % 29-71 arasında değişen oranlar alınmıştır (57,79,80). Daha önce tartışıldığı gibi bu veriler de spoligotiplleme sonuçlarını epidemiyolojik ilişkiyi değerlendirmek amacıyla kullanmanın hatalı olacağını vurgulamaktadır.

Çalışmamızda saptanan majör spoligotip familyalarının değerlendirmesinde; geçici tanımlanmış T süper familyası (%38.6.), LAM7TUR (%27.3) ve Haarlem (%14.8) familyaları ilk üç sırada yer almışlardır. Ayrıca Beijing genotipinden 4 (%0.9) ve Hindistan'ın Delhi bölgesine özgü CAS1-Delhi genotipinden 2 (%.44) suş tespit edilmiştir. Malatya suşları ile yapılan önceki çalışmada geçici tanımlanmış T süper familyası (%22), LAM7TUR (%21) ve Haarlem (%5.3) oranında bulunmuştur (74). Ankara'da yapılan çalışmada ise geçici tanımlanmış T süper familyası (%37), LAM7TUR (%20), Haarlem (%8) ve Beijing genotipinden (%2) bölgemizdekine benzer

oranlar tespit edilmiş(62). Yaklaşık 190 ülkeye ait 45000 *M. tuberculosis* suşuna ait profilleri içeren SpolDB4 veri bankasındaki hiç bir suşla eşleşmeyen %10.9 oranında yalnız suş tespit edilmiştir. Diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla sonuçlarımızı karşılaştırdığımızda; Lari ve ark. İtalya suşlarıyla yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar alınmıştır(77).

Doğu Asya ülkelerinde yapılan çalışmalarda Beijing/W genotipi dirençli suşlar arasında en sık rastlanan familya olmuştur. Honkong'da tiplendirme yapılan 355 izolatin 243'ü (%68.5), Azerbaycan'da mahkumlardan alınan dirençli 46 suşlarla yapılan çalışmada 28 suş (%60.9) Beijing/W olarak tespit edilmiştir. Türkmenistan ve Özbekistan'da ise 382 suşun yarısı Beijing/W genotipi olarak belirlenirken, %19.5 gibi yüksek oranda CAS1-Delhi genotipi elde edilmiştir (58,81,82). Bizim çalışmamızda Beijing/W %0.9 gibi düşük oranda tespit edilmiştir. Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada bu tip %2 oranında bulunurken, Amerika'da 620 Türk hastaya ait izolatların incelenmesiyle Beijing/W oranı bizim sonucumuza oldukça yakın (%1) çıkmıştır (62,83) İzole ettiğimiz 4 Beijing/W suşunun hepsi ÇİD sahipti. IS6110 RFLP bant sayıları 9 (1 suş), 10 (2 suş) ve 16 (1 suş) olarak bulundu. Bu çalışmadaki suşlarda saptanan yüksek sayıda IS6110 kopya sayısı, Beijing/W için tipik olan bir özelliği yansıtmaktadır (81). Ayrıca Beijing/W genotipi gibi ilaç direnci ile ilişkilendirilmeye çalışılan (84) 2 CAS1-Delhi tipinin biri dört majör ilaçlara duyarlı iken diğeri ÇİD'ne sahipti.

Paylaşılan tip (PT) değerleri de SpolDB4 veri tabanı kullanılarak belirlendi. En sık rastlananlar PT41 (87/450) % 19.3, PT 53 (85/450) % 18.8, PT47 (20/450) % 4.4, PT50 (18/450) % 4, PT284 (18/450) % 4, PT196 (10/450) % 2.2. Dünyanın her tarafında yaygın olarak görülen kümeler bizim izolatlarımızda da gösterilmiştir. Farklı olarak genel görülme sıklığı %0.1 düzeyinde olan ve Bulgaristan, Türkiye ve Suudi Arabistan'da yayılım gösteren PT284 bu çalışmamızda %4, bir önceki çalışmamızda ise %3 oranında tespit edilmiştir (74).

Nüfusunun büyük çoğunluğu şehirlerde yaşayan geniş bir coğrafyaya sahip ülkemizde tüberküloz ciddi bir tehdit unsuru olamaya devam etmektedir. Kümeleşme ve primer ilaç direncimizin yüksek olması etkin bir mücadeleden yoksun olduğumuzun bir göstergesidir. Arzu edilen, ülkemizdeki tüberküloz hastalarının tüm klasik epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve buna dayalı olarak yapılacak moleküler tiplene yöntemlerinin sonuçlarından da yararlanılarak daha etkin korunma ve kontrol önlemlerinin geliştirilmesidir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Malatya'dan izole edilen suşlardaki ÇİD oranı ülke geneline göre yüksek bulundu.
2. Dirençli ve duyarlı suşlara özgü IS6110 profili tespit edilmedi.
3. Ülkemiz izolatlarının %28.6'sını düşük kopyalı suşlar oluşturmaktadır.
4. Dünyada yaygın olarak görülen iki kopyalı suşlar ülkemiz izolatlarında da baskın durumdadır.
5. Çalışmamızda bir kopya ve hiç IS6110 kopyası bulundurmayan suşa rastlanmamıştır.
6. Düşük kopya sayılı suşların bölgelere göre dağılımında ve kümleşme oranında farklılık gözlenmedi.
7. Kümeleşme oranlarımızda son üç yılda değişim görülmemiştir.
8. ÇİD oranımızda artış olmasına rağmen Beijing genotipinin görülme sıklığı %0.9 düzeyindedir.
9. Ülkemizde saptanan majör spoligotip familyaları geçici tanımlanmış T süper familyası, LAM ve Haarlem dir.
10. İkinci sıklıkta görülen LAM7 TUR ülkemize özgü bir profil olarak belirlenmiştir.
11. Paylaşılan tip (PT) 284 diğer ülkelere göre daha sık izole edilmiştir.
13. İki yöntemin birlikte kullanılması ile kümeleşme oranımız %45.1 den %48.7 ye çıkmıştır.

ÖZET

TÜRKİYE'NİN FARKLI COĞRAFİK BÖLGELERİNDEN TOPLANAN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İZOLATLARININ IS6110 RFLP VE SPOLİGOTİP PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Tanı, tedavi ve yaşam koşullarındaki ilerlemelere rağmen, tüberküloz günümüzde hala halk sağlığını tehdit eden en önemli enfeksiyon hastalığıdır. DSÖ verilerine göre Türkiye orta insidansa (26/100.000) sahip ülkeler arasında yer almaktadır. Ülkemiz izolatlarının genotipik özelliklerini belirlemek amacıyla Malatya, Marmara, Akdeniz ve Ege Bölgelerinden 2000-2005 yıllarında izole edilen 450 *M. tuberculosis* suşu IS6110 RFLP ve spoligotipleme yöntemleri ile tiplendirildi. IS6110 RFLP ile 304 farklı patern belirlendi. Elli yedi küme (%45.1), 175 özgü (%38.9) profil belirlenirken 72 örnekte (%16) benzer bulundu. Küme içindeki suş sayısı 2-36 ve düşük kopya sayılı suşların oranında %28.6 olarak tespit edildi.

Spoligotipleme ile 384 suşun yer aldığı 47 küme (%85.3) ve 66 özgü (%14.7) profil elde edildi. Veriler SpolDB4 veri bankasındaki suşlarla karşılaştırıldığında hiçbir suşla eşleşmeyen 49 (%10.9) yalnız suş tespit edildi. En sık rastlanan kümeler sırasıyla PT41 (87/450) % 19.3, PT 53 (85/450) % 18.8, PT47 (20/450) % 4.4, PT50 (18/450) % 4, PT284 (18/450) % 4, PT196 (10/450) % 2.2. Spoligotip familyalarından geçici tanımlanmış T süper familyası, LAM ve Haarlem en sık görülen üç familyadır. Çoğul ilaç direnciyle ilişkili olduğu belirlenen Beijing genotipinden %0.9 oranında tespit edildi.

Her iki yöntem birlikte kullanılarak 68 küme (%48.7) ve 231 özgü suş elde edildi. IS6110 RFLP ile benzer olan 72 suştan 39'u ve düşük kopyalı 96 suştan da 73'ü küme oluşturdu. Bölgelere özgü majör bir genotip bulunmazken kümeleşme açısından da anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Kümeleşme oranımızın ve ilaç direncimizin yüksek olması tüberkülozdan korunma ve kontrol önlemlerimizin yetersizliğine işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Spoligotipleme, *M. tuberculosis*, IS6110 RFLP, Moleküler epidemiyoloji, ÇİD

SUMMARY

DETECTION OF IS6110 RFLP AND SPOLIGOTYPE PROFILES OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COLLECTED FROM DIFFERENT REGIONS OF TURKEY

Although improvements in diagnosis, treatment and living condition, tuberculosis has still continued to be one of the most important infectious diseases. According to World Health Organisation (WHO), Turkey with an incidence of 26/100.000 is among the countries having moderate tuberculosis incidence. In order to determine genotypic characteristics of Turkish isolates, a total of 450 *M. tuberculosis* strains collected from Malatya, Marmara, Mediterranean and Aegean Regions in a period of 6 years (2000-2005) were typed by IS6110 RFLP and spoligotyping. IS6110 RFLP yielded 304 different profiles including 57 cluster having 203 strains (45.1%), 175 unique (38.9%), and 72 (16%) similar profiles. Clusters included 2-36 strains. The rate of low copy number strains was established as 28.6%. A total of 113 spoligotyping patterns were observed. Forty-seven spoligotyping-defined clusters totaling 384 patients (85.3%) and 66 (14.7%) unique patterns were found. After comparison with the SpolDB4 database, a total of 49 (10.9%) orphan strains were determined. The major shared-types (STs) encountered in the present study were ST 41 with 87 strains (19.3%), ST53 with 85 strains (18.8%), ST 47 with 20 strains (4.4%), ST 50 with 18 strains (4%), ST 284 with 18 strains (4%), and ST 196 with 10 strains (2.2%). ill-defined T superfamily, Latin-America & Mediterranean (LAM), and Haarlem are the frequently observed three major clades. Beijing genotype which is related to multidrug resistance was detected as 0.9%. By the using of both typing methods, 68 cluster having 219 strains (48.7%) and 231 unique profiles were obtained. Thirty-nine of the 72 strains with similar RFLP profiles and 73 of the 96 strains having low copy number of IS6110 were defined as cluster by spoligotyping. There was no a major genotype which was specific for regions. Also there was no difference among the clustering rates of the regions. The high clustering and drug resistant rates indicate that control and prevention measurements are ineffective in this region.

Key Words: Spoligotyping, *M. tuberculosis*, IS6110 RFLP, Molecular epidemiology, MDR

KAYNAKLAR

1. Köksal, F. Mikobakterilerin Evrimi. 6.Ulusal Mikobakteri Sempozyumu 22-25 Kasım Ankara 2006. Sayfa: 93-96.
2. WHO Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing. WHO Report Geneva 2006.
3. Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M. (Eds): İnfeksiyon Hastalıkları Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1996.
4. Anđ Ö., Uzun, M. Türkiye’de Tüberkülozun Son Durumu. *Klinik Dergisi* Cilt 11 Sayı (1) 1998 Sayfa: 3-5.
5. Özkara, Ş., Aktaş, Z., Özkan, S., Ecevit, H. Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı, Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı 2003.
6. Öztürk, R. Tüberküloz Epidemiyolojisi. IV Tüberküloz Sempozyumu 9-11 Aralık, Malatya, 2005, Sayfa:23-32.
7. Durmaz, R., Gunal, S., Yang, Z., Ozerol, I.H., Cave, M.D. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in Turkey. *Clin Microbiol Infect* (9), 873-877.2003
8. Durmaz, R., Ozerol, I.H., Durmaz, B., et al. Primary Drug Resistance And Molecular Epidemiology of Mycobacterium Tuberculosis Isolates From Patients in A Population With High Tuberculosis Incidence in Turkey. *Microbial Drug Resistance* (9), 361-366, 2003.
9. Durmaz, R. Ülkemizdeki İzolatların Moleküler Epidemiyolojisi IV Tüberküloz Sempozyumu 9-11 Aralık Malatya, 2005, Sayfa: 34-40.
10. Collyns, T.A., Gascoyne-Binzi, D.M., Hawkey, P.M. Molecular Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. Does it Help in Understanding The Epidemiology of Tuberculosis. *Rev Med Microbiol* 13 (3), 119-127, 2002.
11. van Embden, J.D., Cave, M.D., Crawford, J.T., et al. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* By DNA Fingerprinting: Recommendations For A Standardized Methodology. *J Clin Microbiol* (31), 406-409, 1993.
12. van Soolingen, D., de Haas, P.E., Hermans, P.W., van Embden, J.D. DNA Fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis. *Methods Enzymol.*(235), 196–205, 1994.
13. van Soolingen, D. Molecular Epidemiology of Tuberculosis and Other Mycobacterial Infections: Main Methodologies and Achievements. *Journal of Internal Medicine* (249), 1-26, 2001.
14. Lok, K.H., Benjamin, W.H., Kimerling, M.E., Pruitt, V., Lathan, M., Razeq, J., Hooper, N., Cronin, W., and Dunlap, N.E. Molecular Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Without IS6110 Insertions. *Emerg. Infect. Dis* Vol (8), No.11, 1310-1313, 2002.
15. Lok, K.H., Benjamin, W.H., Kimerling, M.E., Pruitt, V., Mulcahy, D., Robinson, N., Keenan, N.B., and Dunlap, N.E. Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains With a Common Two-Band IS6110 Pattern *Emerg. Infect. Dis* Vol (8), No (11), 1303-1305 2002.
16. Toungousova, O.S., Sandven, P., Mariandyshev, A.O., Nizovtseva, N.I., Bjune, G., and Caugant, D.A. Spread of Drug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Strains of The Beijing Genotype in The Archangel Oblast, Russia. *J Clin Microbiol* (40), 1930-1937, 2002.

17. Viedma, D.G., Chaves, F., and Inigo, J. New Route of Importation *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype. *Emerg. Infect. Dis* Vol (12), No (1), 169-170, 2006.
18. Ketenci, Ç.A. Tüberküloz Hastalarının Ev İçi Temashılarında Tüberküloz Enfeksiyonu Tanısında Tam Kan γ -Interferon Testi (Quantiferon-Tb Gold) İle Tüberkülin Cilt Testinin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi. Doktora Tezi İstanbul 2004.
19. Barış, Y.İ. Çağlar Boyu Tüberküloz 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun,2003, Sayfa: 18-33.
20. Kılıçturgay, K. (editör) Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Gediklioğlu, S. Bursa Güneş ve Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, Sayfa:65-82, 1994.
21. Tünger, A., Çavuşoğlu, C., ve Korkmaz, M. Asya Mikrobiyoloji. Asya Tıp Yayıncılık İzmir, Sayfa:172-185, 2003.
22. Murray, P.R., (editor in chief) Manual of Clinical Microbiology Nolte, FS., and Metchock, B. sixth edition Asm Press Washington D.C., 400- 437 1995.
23. Köksal F., Yaman A. Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, 2003, Sayfa:34-47.
24. Alp, A. Non-Moleküler Tekniklerin Tanı Amaçlı Kullanımları. IV Tüberküloz Sempozyumu Malatya, 2005, Sayfa:98-103.
25. Sarıgüzel, SN. Direkt Mikroskopi Teknikleri ve Değerlendirilmesi. IV Tüberküloz Sempozyumu Malatya, 2005, Sayfa:161-167.
26. Avkan, V.O. Auramine-Rhodamine Floresan Boyama. IV Tüberküloz Sempozyumu Malatya, 2005, Sayfa:168-172.
27. Kırkıl, G., Özel, E., Turgut, T., Deveci, F., ve Muz, H. Akciğer Tüberkülozlu Olgularda Mevcut Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi. *Akciğer Arşivi* (7),2006, Sayfa:30-33.
28. Bass, J.B Jr. Epidemiology of Tuberculosis (UpToDate 2005,version13.3) www.uptodate.com/subscribers/index.asp.
29. Kılıçaslan, Z. Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz Epidemiyolojisi ve Kontrolü. Uzun, M., Ünal, S. (eds). Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları, Cilt 2, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 821-833, 2002.
30. Özkara, Ş. Dünya’da ve Türkiye’de Çok İlaça Dirençli Tüberküloz. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu 22-25 Kasım, Ankara, 2006 sayfa: 197-204.
31. Özerol, İH. Yeni Tüberküloz Aşılı. IV Tüberküloz Sempozyumu Malatya, 2005, Sayfa:104-144.
32. Çelenk, M. Tüberküloz Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* Cilt 14, 1994, Sayfa: 391-403.
33. Caminero, J.A., Pena, M.J., Campos, M.I.-Herrero, Rodriguez, J.C., Garcia, I., Cabrera, P., Lafoz, C., Samper, S., Takiff, H., Afonso, O., Pavon, J.M., Torres, M.J., Soolingen, van D., Enarson, D.A. and Martin, C. Epidemiological Evidence of The Spread of a *Mycobacterium tuberculosis* Strain of The Beijing Genotype on Gran Canaria Island. *Am.J Respir.Crit Care Med.* (164), 1165-1170.2001.
34. Kocagöz, S. Ribotiplendirme, Plazmit Profili ve Pulsed-Field Gel Elektrofrezisi (PFGE) ile Restriksiyon Enzim Analizi. *Mikrobiyoloji Bülteni* (34), 2000, Sayfa:141-144.
35. Derbentli, S. Hastane Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisinde Moleküler Biyolojik Yöntemlerin Yeri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları* No 42, 2002, Sayfa: 7-13.
36. Durmaz, R. Tüberkülozun Epidemiyolojik Araştırmalarında Laboratuvarın Yeri. 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, 2003, Sayfa: 443-456.

37. Durmaz, R. Moleküler Epidemiyoloji Neden Gerekli, Başlarken Nelere Dikkat Edilmelidir?. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Ankara, 2004, Sayfa:52-59.
38. Hoşoğlu, S. Moleküler Epidemiyolojide Temel Yöntemler. 3.Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Ankara, 2004, Sayfa:60-62.
39. Şener, B. Bakterilere Yönelik Moleküler Epidemiyolojik Çalışmalar. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Ankara, 2004, Sayfa:63-69.
40. Durmaz, R. Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı 2001, Sayfa: 139-147.
41. Durmaz, R. Tüberkülozun Moleküler Epidemiyolojisinde Yeni Gelişmeler. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu 9-12 Aralık, İzmir, 2004, Sayfa:41-46.
42. Durmaz, B., Durmaz, R. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, Sayfa: 161-168, 2001.
43. Singh, S.P., Salamon, H., Lahti, C.J., Ferid-Moyer, M. and Small, P.M. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Epidemiologic and Population Genetic Studies of *Mycobacterium tuberculosis* *J Clin Microbiol.* 1927-1931, 1999.
44. Yang, Z., Chaves, F., Barnes ,PF., et al. Evaluation of Method For Secondary DNA Typing *Mycobacterium Tuberculosis* With Ptb12 in Epidemiological Study of Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* (34),3044-3048, 1996.
45. Durmaz, R. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının genotiplendirilmesi: IS6110 ve pTBN12 fingerprinting. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, Sayfa: 181-200, 2001.
46. Kamerbeek, J., Schouls,L., Kolk,A., Agterveld, van M., Soolingen, van D., Kuijper,S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., and Embden, van J. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium Tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J Cli Microbiol.* (35), 907-914, 1997.
47. Kremer, K., Bunschoten, A., Schouls ,L., Soolingen, van D. and Embden, van J. “Spoligotyping” A PCR-Based Method to Simultaneously Detect and Type *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands version .2002.
48. Brudey, K., Driscoll, J.R., Rigouts, L., Prodinger, W.M., Gori, A., Hajoj, S.A. Al., Allix, C., Aristimuno, L., Arora, J., Baumanis, V., Binder, L., Cafrune, P., Cataldi, A., Cheong, S., Diel, R., Ellermeier, C., Evans, J.T., Fauville, M.-Dufaux, Ferdinand, S., Garcia, D., Garzelli, V.C., Gazzola, L., Gomes, H.M., Guttierrez, M.C., Hawkey, P.M., Helden, van D.P., Kadival, G.V., Kreiswirth, B.N., Kremer, K., Kubin, M., Kulkarni, S.P., Liens, B., Lillebaek, T., Ho, M.L., Martin, C., Martin, C., Mokrousov, I., Narvskaia, O., Ngeow, Y.F., Naumann, L., Niemann, S., Parwati, I., Rahim, Z., Rasolofo, V.-Razanamparany, Rasolonavalona, T., Rossetti, M.L., Rusch, S.-Gerdes, Sajduda, A., Samper, S., Shemyakin, I.G., Singh, U.B., Somoskovi, A., Skuce, R.A., Soolingen, van D., Streicher, E.M., Suffys, P.N., Tortoli, E., Tracevska, T., Vincent, V., Victor, T.C., Warren, R.M., Yap, S.F., Zaman, K., Portaels,F., Rastogi, N. and Sola, C. *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Genetic Diversity: Mining The Fourth International Spoligotyping Database (Spoldb4) For Classification, Population Genetics And Epidemiology. *BMC.Microbiol.* (6), (23),1-17, 2006.
49. Abed, Y., Davin-Regli, A., Bollet, C., and Micco, de P. Efficient Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* Strains by 16S-23S Spacer Region-Based Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *J Microbiol* 1418-1420, 1995.
50. Singh, H.B., Chauhan, D.S., Singh, D., Das, R., Srivastava, K., Yadav, V.S., Kumar, A., Katoch, V.M. and Sharma, V.D. Rapid Discrimination of Indian Isolates of

- Mycobacterium tuberculosis* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis-A preliminary Report. *Indian J Med Microbiol* (20), (2), 69-71, 2002.
51. Harn, H.J., Shen, K.L., Ho, L.I., Yu, K.W., Liu, G.C., Yueh, K.C. and Lee, J.H. Evidence of Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fingerprinting in Taipei City, Taiwan. *J Clin Pathol.*(50), 505-508, 1997.
 52. Mokrousov, I., Narvskaya, O. Methods for DNA Fingerprinting and Genotypic Detection of Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Protocols. S. Angeloff Institute of Microbiology, *Bulgarian Academy of Sciences* 25-30, 2004.
 53. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V. et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Typing. *J. Microbiol.* (33), 2233-2239, 1995.
 54. Tazi, L., Kreiswirth, B., Carrere, C. and Tibayrenc, M. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Its Relevance to The Surveillance and Control of TB: an E-debate Infection. *Genetics and Evolution* (2), 153-158, 2002.
 55. Koo, D., Royce, S., Rutherford, G.W. Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Berkeley California, 1991 To 1992. *West J Med* 1(63), 441-445, 1995.
 56. Small, P.M., Hopewell, P.C., Singh, S.P., Paz A, Parsonnet, J., Ruston, D.C., Schecter, G.F., Daley, C.L., Schoolnik, G.K. The Epidemiology of Tuberculosis in San Francisco. A population-Based Study Using Conventional and Molecular Methods. *N Engl J Med.* (16), 330 (24),1703-1709, 1994.
 57. Parissa, F., Foorozan, M., Masjedib, M.R., Varnerota, A., Zarifib, A.Z., Tabatabaeb, J., Douragheib, M., Ghazisaedib, K., Mansorrib, D., Bahadorib, M., Vincenta, V., Gutierrez, C., Velayatib, A.A. Evaluation of Tuberculosis Transmission in Tehran: Using RFLP and Spoligotyping Methods. *Journal of Infection* (49), 94–101, 2004.
 58. Cox, H.S., Kubica, T., Doshetov, D., Kebede, Y., Rüsç-Gerdess, S., and Niemann, S. The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia *Respiratory Research* (6), 134, 2005, doi:1186/1465-9921-6-134.
 59. Tudo, G., Gonzalez-Martin, J., Obama, R., Rodriquez, J.M., Franco, J.R., Espasa, M., Simarro, P.P., Escaramis, G., Ascaso, C., Garcia, A., Jimenez De Anta, M.T. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in the Bata and Malabo Districts of Equatorial Guinea. *Int J Tuberc Lung Dis* 8 (12), 1458-1463, 2004.
 60. Borgdorff, W.M., Haas de, P., Kremer, K., and van Soolingen, D. *M. tuberculosis* Beijing genotype, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis* Vol 9, No 10, 1310-1313, 2003.
 61. Pfyffer, G.E., Strassle, A., Rose, N., Wirth, R., Brandli, O., and Shang, H. Transmission of tuberculosis in the metropolitan area of Zurich: a 3year survey based on DNA fingerprinting. *Eur. Respir. J.* 11 804-808, 1998.
 62. Gencer, B., Shinnick, T.M. Molecular Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Turkey. *Am. J Infec Dis.* (1), (1), 5-11, 2005.
 63. Öztürk, C.E., Balbay, O.A., Kaya, D., Ceyhan, I., Bulut, I., Sahin I. The Resistance to Major Antituberculous Drugs of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated from the Respiratory System Specimens of Tuberculosis Patients in Duzce, Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 58(1),47-49, 2005.
 64. Bengisun, J.S., Karnak, D., Palabiyikoglu, I. and Saygun, N. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Turkey, 1976–97. *Scand J Infect Dis* 32(5), 507-510, 2000.
 65. Senol, G., Komurcuoglu, B., Komurcuoglu ,A. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in western Turkey : a retrospective study from 1100-bed teaching hospital. *J infect* Vol 50, No 4, 306-311, 2005.

66. Surveillance of multi-drug-resistant tuberculosis in Europe (MDR-TB surveillance) Project outline, 2006.
67. Asgharzadeh, M.; Shahbadian, K.; Majidi, J.; Aghazadeh, A.M.; Amini, C.; Jahantabi, A.R.; Rafi, A. IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from East Azerbaijan Province of Iran. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (101), (5), doi: 10.1590/S0074, 2006.
68. Munsiff, S.S., Bassoff, T., Nivin, B., Li, J., Sharma, A., Bifani, P., Mathema, B., Driscoll, J., and Kreiswirth, B.N. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant Tuberculosis, New York City, 1995–1997. *Emerg. Infect. Dis.* Vol 8, No 11 1230-1237, 2002.
69. Heldal, E., Dahle, U.R., Sandven, P., Caugant, D.A., Brattaas, N., Waaler, H.T., Enarson, D.A., Tverdaz, A., Kongerud, J. Risk Factors for Recent Transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Eur Respir* (22), 637–642, 2003.
70. Rastogi N. Comparison of Different Methods for Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu 22-25 Kasım Ankara 2006. Sayfa: 93-96.
71. Dahle, U.R., Sandven, P., Heldal, E., and Caugant, D.A. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway. *J Clin Microbiol.* 39, 1802-1807, 2001.
72. Miller, A.C., Sharnprapai, S., Suruki, R., Corkren, E., Nardell, E.A., Driscoll, J.R., McGarry, M., Taber, H., and Etkind, S. Impact of Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* on Public Health Practice in Massachusetts. *Emerg. Infect. Dis.* (8), 1285-1289, 2002.
73. Ellis, B.A., Crawford, J.T., Braden, C.R., McNabb, J.N., Moore, M., and Kammerer, S. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in a Sentinel Surveillance Population - Tuberculosis Genotyping Network. *Emerg. Infect. Dis.* (8), 1197-1208, 2002.
74. Zozio, T., Allix, C., Gunal, S., Saribas, Z., Alp, A., Durmaz, R., Fauville, M.-Dufaux, Rastogi, N. and Sola, C. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Two Cities of Turkey: Description of a New Family of Genotypes That is Phylogeographically Specific for Asia Minor. *BMC Microbiology.* 5:44 doi:10.1186/1471-2180-5-44, 2005.
75. Filliol, I., Driscoll, J.R., van Soolingen, D., Kreiswirth, B.N., Kremer, K., Valétudie, G., Anh, D.D., Barlow, R.I., Banerjee, D., Bifani, P.J., Brudey, K., Cataldi, A., Cooksey, R.C., Cousins, D.V., Dale, J.W., Dellagostin, O.A., Drobniewski, F., Engelmann, G., Ferdinand, S., Gascoyne-Binzi, D., Gordon, M., Gutierrez, M.C., Haas, W.H., Heersma, H., Källenius, G., Kassa-Kelembho, E., Koivula, T., Ly, H.M., Makristathis, A., Mammina, C., Martin, G., Moström, P., Mokrousov, I., Narbonne, V., Narvskaya, O., Nastasi, A., Niobe-Eyangoh, S.N., Pape, J.W., Rasolof-Razanamparany, V., Ridell, M., Rossetti, M.L., Stauffer, F., Suffys, P.N., Takiff, H., Texier-Maugein, J., Vincent, V., de Waard, J.H., Sola, C., and Rastogi, N. Global Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes. *Emerg. Infect. Dis.* (8) 1347-1349, 2002.
76. Nguyen, D., Brassard, P., Menzies, D., Thibert, L., Warren, R., Mostowy, S. and Behr, M. Genomic Characterization of an Endemic *Mycobacterium tuberculosis* Strain: Evolutionary and Epidemiologic Implications. *J Clin Microbiol.* 2573–2580, 2004.
77. Lari, N., Rindi, L., Sola, C., Bonanni, D., Rastogi, N., Tortoli, E., and 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.* 1617–1624, 2005.
78. Bauer, J., Yang, Z., Poulsen, S. and Andersen, A.B. Results From 5 Years of Nationwide DNA Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates in a

- Country With a Low Incidence of *M. tuberculosis* Infection *J Clin Microbiol*. 305–308, 1998.
79. Clark, C.M., Driver, C.R., Munsiff, S.S., Driscoll, J.R., Kreiswirth, B.N., Zhao, B., Ebrahimzadeh, A., Salfinger, M., Piatek, A.S., Abdelwahab, J., and the New York City Molecular Epidemiology Working Group¹. Universal Genotyping in Tuberculosis Control Program, New York City, 2001–2003. *Emerg. Infect. Dis.* Vol. 12, No. 5, 2006.
 80. Drobniowski, F., Balabanova, Y., Ruddy, M., Weldon, L., Jeltkova, K., Brown, T., Malomanova, N., Elizarova, E., Melentyey, A., Mutovkin, E., Zhakharova, S., and Fedorin, I. Rifampin- and Multidrug-Resistant Tuberculosis in Russian Civilians and Prison Inmates: Dominance of the Beijing Strain Family. *Emerg. Infect. Dis* Vol. 8, No. 11, 1320-1326, 2002.
 81. Pfyffer G.E., Strassle A., Multidrug-Resistant Tuberculosis in Prison Inmates, Azerbaijan. *Emerg. Infect. Dis* Vol.7 No.5 2001.
 82. Kam, K.M., Yip, C.W., Tse, L.W., Wong, K.L., Lam, T.K., Kremer, K., Yan Au, B.K., and van Soolingen, D. Utility of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing for Differentiating Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates of the Beijing Family *J Clin Microbiol*, 306–313, 2005.
 83. 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* Vol 12 No 5 736-747, 2006.
 84. Streicher, E.M., Warren, R.M., Kewley, C., Simpson, J., Rastogi, N., Sola, C., van der Spuy, G.D., van Helden, P.D., and Victor, T.C. Genotypic and Phenotypic Characterization of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Rural Districts of the Western Cape Province of South Africa. *J Clin Microbiol*, 891–894, 2004.

EKLER

EK1: IS6110 RFLP Yönteminde kullanılan tampon ve çözeltiler

TBE Buffer (Tris-Borik asit- EDTA): Stok solüsyon (10x, pH 8.0)

Tris base 121.1 gm

Borik asit 55.55 gm

EDTA (iki sulu) 3.8 gm

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanır.

0.5 M EDTA'nın hazırlanışı

EDTA 2H₂O 37.22 gm 160 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözünmesi sağlanır. pH'nın 8.0 olması için NaOH peleti ilave edilir. Otoklavda steril edilerek kullanılır.

Etidyum bromür (5 mg/ ml stok) son derece mutajenik bir maddedir. Tartımlarda mutlaka eldiven giyilmeli, maske kullanılmalı, kesinlikle etrafa bulaştırmamaya özen gösterilmelidir.

Etidyum bromür'ün 50 mg'ı 10 ml distile suda, manyetik karıştırıcı üzerinde bir kaç saat karıştırılarak, çözünmesi ile hazırlanır. Renkli şişeye konur ve şişenin etrafı aliminyum foil ile kapatılır. Hazırlanan bu çözeltilerden her 100 ml agarozaya nihayi konsantrasyon 0.5 ng/ml olacak şekilde eklenir.

TE tamponu (pH=8): Total hacim 200ml için.

a) 10mM Tris HCl için

315.12 mg/200ml

b)Yukarıdaki çözelti içinde 1mM EDTA hazırlamak için 74.45 mg EDTA çözeltiye eklenir.

Maddeler iyice çözüldükten sonra pH=8.0 'a ayarlanır.

%10'luk SDS

50 gm SDS 450 ml distile suda çözünür. İyice çözünmesi için 68°C'deki su banyosunda bekletilir. Sonra toplam hacim 500 ml'ye tamamlanır.

1N HCl:

8.5 ml konsantre HCl

91.5 ml distile su üzerine ilave edilir.

2 M Tris HCl

Tris HCl 177.6 gm

Tris base 106.0 gm

Distile su 900 ml ilave edilir, çözüldükten sonra toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanır

Gel loading dye: (Endostop solusyonu)

Bromphenol 40 mg

Gliserol 5 ml

EDTA (0.5 M) 1.5 ml

Distile su 4.5 ml

Total volüm 10 ml hazırlandıktan sonra 500µl mikrotüplere dağıtılır ve buzdolabında saklanır.

5 M NaCl

292.2 gm NaCl 950 ml distile suda çözüldükten sonra toplam hacim 1 litreye tamamlanır.

10 N NaOH

200 gm NaOH 400 ml suda çözüldükten sonra toplam hacim 500 ml'ye tamamlanır.

*Oldukça dikkatli çalışılmalıdır. Yüksek NaOH konsantrasyonundan dolayı tüp ısınmaktadır.

Mutlaka eldiven giyilmeli ve lavabo kenarında çalışılmalıdır.

Primer yıkama solusyonu

Üre 360 gm

SDS ... 4 gm

20xSSC ..5 ml

Distile su ile toplam hacim bir litreye tamamlanır.

20 x SSC

NaCl 175.3 gm

Sodyum sitrat 88.2 gm

950 ml suda çözüldükten sonra toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanır. Buz dolabında saklanır.

Sekonder yıkama solusyonu

20xSSC 100 ml

Distile su 900 ml

Nötralizasyon solusyonu

Tris-HCl (2M) 150 ml

NaCl (5M) 120 ml

Distile su 330 ml

Transfer solusyonu

60 ml 10 N NaOH

180 ml 5 M NaCl

1260 ml distile su

CTAB (N-cetyl-N, N, N-trimethyl amonyum bromür)

10 gm CTAB

100 ml distile suda ısıtılarak (65 °C) çözülür. Oda ısısında en fazla 6 ay saklanabilir.

EK2: Spoligotipleme yönteminde kullanılan tampon ve çözeltiler

0.5 M EDTA (pH:8.0)

186.12 g EDTA. 2 H₂O/ L distile su

20mM EDTA (pH 8.0)

40 ml 0.5 M EDTA

960 ml distile su

20X SSPE

0.2 M Na₂HPO₄. 2 H₂O 35.6 g

3.6 M NaCl 210.24 g

0.5 M EDTA 40 ml

Distile su 960 ml

% 10 SDS

100 g SDS önceden 60 °C ye getirilmiş 950 ml distile suda iyice çözüldükten sonra 1000 ml ye tamamlanır. (oda ısısında bekletilmelidir ve en fazla bir ay içinde kullanılmalıdır)

2X SSPE + 0.1 SDS

890 ml distile suya 100 ml 20X SSPE ve 10 ml %10 SDS ilave edilir.

2X SSPE + 0.5 SDS

850 ml distile suya 100 ml 20X SSPE ve 50 ml %10 SDS ilave edilir

ÖZGEÇMİŞ

Malatya 1964 doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi burada tamamladıktan sonra, 1982 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdim. 1987 yılında mezun oldum. 1988-1989 yılları arasında yedek subay olarak askerliğimi yaptım. 1991 yılında Adıyaman SSK hastanesinde Biyolog olarak göreve başladım. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinin açmış olduğu sınavı kazanarak halen çalışmakta bulunduğum Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Biyolog olarak çalışmaya başladım. 1995-1997 yılları arasında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans yaptım. 1998 yılında aynı bölümde Doktora öğrenimime başladım. 14'ü yurt dışı olmak üzere 40 makale, poster ve bildirim bulunmaktadır. Tüberkülozun moleküler epidemiyolojisini belirlemeye yönelik üç Tübitak projesinde görev aldım. Yabancı dilim İngilizcedir.

Evli ve bir çocuk babasıyım.