

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Uzmanlık öğrencisinin adı: Dr. Ümit ALANBAYI

Çalışmanın Başlığı: Çok İlaç Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesinde “Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Eğitim Programı” çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışmada belirtilen jüri üyeleri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 1/11/2013

mza

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji A. D.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Rıza DURMAZ

mza

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fak.

Tıbbi Mikrobiyoloji A. D.

Üye

Prof. Dr. Ziya Cibali AÇIKGÖZ

mza

Turgut Özal Üniversitesi, Tıp Fak.

Tıbbi Mikrobiyoloji A. D.

Üye

Prof. Dr. Mustafa ULUKANLIGİL

TE EKKÜR

Bu Çalı ma 2013/54 Nolu Proje olarak Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Ara tırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmi tir. Çalı manın bütün masraflarını kar ılayan Kırıkkale Üniversitesi Rektörlü ü'ne te ekkür ederim.

TE EKKÜRLER

Uzmanlık e itimim süresince her konuda emek, anlayı , bilgi ve deste ini esirgemeyen, sabırla hep yanımda olan de erli hocam ve tez danı manım Prof. Dr. Rıza DURMAZ'a,

Uzmanlık e itimim süresince bilgilerini ve deneyimlerini payla an de erli hocalarım; Prof. Dr. J. Sedef GÖÇMEN'e, Doç. Dr. Zafer Teoman APAN'a, Doç. Dr. Latife ER 'ye, Doç. Dr. Altan AKSOY'a

Tezim için gerekli su ları temin etmemde yardımcı olan Türkiye Halk Sa lı ı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Ba kanlı ı Tüberküloz Ara tırma ve Uygulama Laboratuvarı'na, Dr. Ahmet ASLANTÜRK'e, Dr. Hülya M EK'e,

Türkiye Halk Sa lı ı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Ba kanlı ı Moleküler Mikrobiyoloji Ara tırma ve Uygulama Laboratuvarı'na, Dr. Veteriner Hekim Alper KARAGÖZ ve di er çalı anlara,

Birlikte çalı maktan dolayı mutluluk duydu um asistan arkadaş ım, Dr. Tu ba ATALAY'a, laboratuvar teknisyeni Tuba GÖKMEN'e, biyolog Sinem ÖZDEM R'e, uzmanlık e itimim boyunca hep yanımda olan sevgili e im Yurdanur ALANBAYI'na, anne ve babama, en büyük mutluluk kayna ım olan kızım Yade'ye te ekkür ederim.

Dr. Ümit ALANBAYI

Kasım 2013

ÖZET

ALANBAYI Ü. Çok İaca Dirençli *Mycobacterium Tuberculosis* Su larının Moleküler Karakterizasyonu, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2013

Tüberküloz kontrolünde uygun antibiyotik tedavisi ve bula zincirinin kırılması en önemli hususlardır. Bu çalı mada Çok İaca Dirençli (Ç D) tüberküloz kontrolünde direncin mekanizmasının anla ılması ve su lar arasındaki çapraz bula ın ortaya konması amaçlanmı tır. Çalı maya 52 *Mycoobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) su u alınmı tır. Ç D su larda rifampsin (RIF) ve izoniazid (INH) direncinden sorumlu mutasyonlar DNA (Deoksiribo nükleik asit) dizi analizi yöntemiyle belirlenmi tir. Su lar arasındaki filogenetik ili ki spoligotiplendirme yöntemiyle belirlenmi tir. Çapraz bula ı ortaya koymada 24 lokuslu Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR) yöntemi kullanılmı tır. Mutasyon analizi yapılan 52 izolatın %98’inde *rpoB* gen bölgesinde mutasyon saptandı. zolatların %57’sinde 531. kodonda, %23’ünde 516. kodonda, %17’sinde 526. kodonda mutasyon saptandı. *rpoB* gen bölgesinde olu an en sık aminoasit de i ikli i ise Ser531Leu aminoasidi de i ikli i olarak belirlenmi tir. zoniazide dirençli 52 su un %86’sında *katG* gen bölgesinde mutasyon saptandı. zolatların %84’ünde 315. kodonda, bir su ta ise 273. kodonda mutasyon kaydedildi. Spoligotipleme profilleri çıkarılan su lar, on be farklı spoligotipi sergilemi olup bunlardan 11 tanesi küme olu turan su ları bulundurmaktadır. Toplam 48 su (%92.3) küme içerisinde yer almı tır. Su ların 21’inin (%40.3) T ailesinden, 14’ünün (%26.9) LAM (Latin Amerika Akdeniz) ailesinden, 4’ünün H (Haarlem) (%7.6) ailesinden, üçer su un (%5.7) X, S ailelerinden, iki er tanesinin (%3.8) Beijing ve U ailelerinden, olu tu u görüldü. Üç su (%5.7) özgü profil sergilemi tir. MIRU-VNTR yöntemiyle tiplendirmesi yapılan 52 *M. tuberculosis* su undan 49 farklı genotip saptandı. Bu genotiplerden üç tanesi küme olu turan su ları içermektedir. Toplam altı su (%11.5) küme içerisinde yer aldı.

Sonuç: ncelenen su larda saptanan mutasyonlar dünya genelinde yaygın olan mutasyonlardır. Su lar arasındaki %11'lik çapraz bula kontrol önlemlerinin etkinli ini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotiplendirme, MIRU-VNTR, *katG*, *rpoB*, *inhA*, klonal li ki, mutasyon.

ABSTRACT

ALANBAYI Ü. Molecular Characterization of Multidrug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains. Kırıkkale University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology. Thesis of Speciality, Kırıkkale, 2013.

Suitable antibiotic treatment and interruption of the cross- contamination are the most important subjects in the tuberculosis control. In this study, it is aimed to understand the mechanism of drug resistance to point out cross contamination among the Multi Drug Resistance tuberculosis (MDR). This study was carried on 52 *M. tuberculosis* strains among MDR strains mutations responsible for RIF and INH resistance were detected by the DNA sequencing. Phylogenetic relationship among the strains was searched by Spoligotyping method. To reveal cross contamination, 24 locused MIRU- VTNR method were used. After mutation analyses, it was observed that 98% of 52 isolates had the mutation at their *rpoB* gen locations. Mutation was detected at 57% of isolates in 531th codon, 23% in 516th codon, 17% in 526th codon. The most frequent aminoacid alteration was detected as Ser531Leu. *katG* Mutation was detected in 86% of the 52 *M. tuberculosis* strains having INH resistance. The frequency of mutation detected at codon 315 was predominant (84%) followed by codon 273 (2%). Spoligotyping demonstrated 15 different spoligotype and 11 of them contains clustered strains. Totally 48 strains (92.3%) were existed in cluster and it was observed that 21 of them (40.3%) derived from T family, 14 of them (26.9%) from LAM family, 4 of them (7.6%) from H family, 3 each strain (5.7%) from X, S families, two each (3.8%) derived from Beijing and U families. 3 strains (5.7%) demonstrated unique profile. MIRU-VNTR yielded 49 different genotypes among the 52 *M. tuberculosis* strains. Three of these genotypes included clustered strains, totally six (11,5%) strains were in cluster.

In conclusion: Detected mutations from observed strains are world wide common ones. The low rate (11%) of cross- contamination between strains supports the efficiency of control precautions.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotyping, MIRU-VNTR, *katG*, *rpoB*, *inhA*, clonal relationship, mutation.

Ç NDEK LER

ONAY SAFYASI	iii
TE EKKÜR.....	iv
TE EKKÜRLER.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
Ç NDEK LER.....	x
S MGELER ve KISALTMALAR.....	xiv
EK LLER.....	xvii
TABLolar.....	xviii
G R	1
GENEL B LG LER	3
2.1. TAR HÇE.....	3
2.2. MYCOBAKTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS' N	4
EVR MSEL GEL M	4
2.3. EP DEM YOLOJ	6
2.4. MYCOBAKTERIUM TUBERCULOSIS' N BAKTER YOLOJ K KARAKTER	7
2.4.1. Sınıflandırma	7
2.4.2. Bakteriyolojik Özellikler	8
2.4.3. Virülans.....	10
2.4.4. Patogenez.....	11
2.4.5. Klinik Tablolar.....	12

2.5. ANT TÜBERKÜLOZ LAÇLAR ve D RENÇ MEKAN ZMALARİ.....	13
2.5.1. zoniazid.....	14
2.5.2. Rifampisin.....	14
2.5.3. Prizinamid.....	14
2.5.4. Streptomisin.....	15
2.5.5. Etambutol.....	15
2.6. D RENÇ N SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER	15
2.6.1. Fenotipik Yöntemler	16
2.6.1.1. Proporsiyon Yöntemi	16
2.6.1.2. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi	17
2.6.1.3. Direnç Oran Yöntemi.....	17
2.6.2. Direncin Saptanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler.....	17
2.6.2.1. Katı Faz Hibridizasyon Yöntemleri	18
2.6.2.2. DNA Microarray	18
2.6.2.3. Multipleks Alel Spesifik PZR	18
2.6.2.4. Heterodubleks Analizi.....	18
2.6.2.5. Single Strand Conformation Polymorphism	19
2.6.2.6. Gerçek Zamanlı PZR.....	19
2.6.2.7. Direncin Saptanmasında Sekans Analizi	19
2.7. KORUNMA ve KONTROL	21
2.7.1. Moleküler Yöntemlerin Katkısı	21
2.7.2. Moleküler Epidemiyolojik Yöntemlerin Mekanizması	22
2.7.2.1. IS 6110 RFLP.....	22
2.7.2.2. Spoligotiplendirme.....	23
2.7.2.3. MIRU –VNTR	25
GEREÇ ve YÖNTEM.....	27

2.4. <i>MYCOBAKTERIUM TUBERCULOSIS</i> SU LARI.....	27
3.2. R FAMP S N ve ZON AZ D D RENC N N FENOT P K YÖNTEMLERLE DO RULANMASI.....	27
3.2.1. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	27
3.2.2. Besiyerlerine Ekim ve Sonuçların De erlendirilmesi	28
3.3. R FAMP S N ve ZON AZ D D RENC NDEN SORUMLU MUTASYONLARIN BEL RLENMES	28
3.3.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu:.....	28
3.2.2. LJ Besiyerinden DNA zolasyonu	29
3.3.3. Rifampisin Direncinin Belirlenmesi	30
3.3.3.1. <i>rpoB</i> Geninin Amplifikasyonu.....	30
3.3.3.2. Agoroz Jel Elektforezi	31
3.3.3.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Pürifikasyonu.....	32
3.3.3.4. Agoroz Jel Elektforezi	33
3.3.3.5. Dideoksi Terminatör Tepkimesi	33
3.3.3.6. Sekans Ürünlerinin Temizlenmesi	34
3.3.3.7. DNA Kapiller Jel Elektforezi	34
3.3.4. zoniazid Direncinin Belirlenmesi	35
3.3.4.1. <i>katG</i> ve <i>inhA</i> Promoter Geninin Amplifikasyonu	35
3.3.4.2. Agoroz Jel Elektforezi	36
3.3.4.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Pürifikasyonu.....	37
3.3.4.4. Agoroz Jel Elektforezi	37
3.3.3.5. Dideoksi Terminatör Tepkimesi	38
3.3.3.6. Sekans Ürünlerinin Temizlenmesi:.....	38
3.3.3.7. DNA Kapiller Jel Elektforezi	38
3.4. MOLEKÜLER T PLEND RME.....	38

3.4.1. Spoligotiplendirme.....	38
3.4.2. PZR	39
3.4.3. PZR Ürününün Hibridizasyonu ve Sonuç Gözleme	40
3.4.3.1. Hibridizasyon Yöntemi	40
3.4.3.2. Yorumlama.....	41
3.4.3.3. Spoligotiplendirme Metodunda Kullanılan Çözeltiler	42
3.4.2. MIRU-VNTR.....	43
3.4.2.1. Amplifikasyon Karı ımlarının Hazırlanması	44
3.4.2.2. Amplifikasyon Sonrası Cihaza Yükleme ımleri ve Fragman Analizi:.....	48
3.5. ET K KURUL ONAYI	50
BULGULAR	51
4.1. FENOT P K D RENÇ SAPTAMA BULGULARI	51
4.2. MOLEKÜLER TEST BULGULARI.....	51
4.2.1. Rifampisin Direnç Mutasyonları	51
4.2.2. zoniazid Direnç Mutasyonları <i>katG</i> Geni.....	55
4.2.3. zoniazid Direnç Mutasyonları <i>inhA</i> Geni.....	57
4.2.4. Spoligotiplendirme.....	59
4.2.4.1. Kümeleme.....	60
4.2.4.2. Spoligo Paterni	61
4.2.4.2.1. Spoligo International Type (SIT)	61
4.2.4.2.2. Spoligofamilya	61
4.2.3. MIRU-VNTR.....	64
TARTI MA	71
SONUÇ ve ÖNER LER.....	79
KAYNAKLAR	80

S İMGELER ve KISALTMALAR

Ç D:	: Çok ilaca dirençli
<i>M. tuberculosis</i> :	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
RIF:	: Rifampsin
INH:	: zoniazid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
MIRU:	: Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit
VNTR:	: Variable Number Tandem Repeats
LAM :	: Latin Amerika Akdeniz
H:	: Haarlem
MDR:	: Multi Drug Resistant
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
BCG	: Bacillus Calmette Guerin
MTK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi
M.Ö.	: Milattan Önce
SM	: Streptomisin
PAS	: Paraaminosalisilik asit
PRZ	: Prizinamid
RD	: <i>Region of difference</i>
TbD	: <i>M. tuberculosis specific deletion</i>
DT	: ilaç duyarlılık testi

PPD	: Safla tırlımlı protein derivesi
RNA	: Ribonükleik asit
NCCLS	: National Committe For Clinical Laboratory Standarts
LJ	: Lowenstein Jensen
CFU	: Colony forming units
ml	: Mililitre
M K	: Minimum inhibitör konsantrasyon
RFLP	: Restriction Fragment Lenght Polimorfizm
DR	: Direkt tekrar
SIT	: Spoligotype international type
PNB	: Para-nitrobenzoik asit
CTAB	: N-acetyl-N, N, N-trimethyl amonyum bromür
M	: Molar
mM	: Milimolar
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
NAACL	: Sodyum klorür
µl	: Mikrolitre
nm:	: Nanometre
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
dH ₂ O	: Distile su
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit

SLS : Sample loading solution

°C : Santigrad derece

EK LLER

Sayfa no:

ekil 1: <i>M. tuberculosis</i> kompleks türleri arasındaki filogenetik ili ki	5
ekil 2: Spoligotiplendirme yönteminin a amaları.	24
ekil 3: <i>M. tuberculosis</i> genomunda 41 MIRU lokusu	26
ekil 4: <i>rpoB</i> PZR amplifikasyon görüntüsü.	32
ekil 5: <i>rpoB</i> PZR pürifikasyon görüntüsü.	33
ekil 6: <i>katG</i> PZR amplifikasyon görüntüsü.	36
ekil 7: <i>inhA</i> PZR amplifikasyon görüntüsü.	37
ekil 8: <i>katG</i> PZR pürifikasyon görüntüsü.	37
ekil 9: <i>inhA</i> PZR amplifikasyon görüntüsü.	38
ekil 10: <i>rpoB</i> gen bölgesine ait örnek elektroferogram görüntüsü.	51
ekil 11: <i>katG</i> gen bölgesine ait örnek elektroferogram görüntüsü.	55
ekil 12: <i>inhA</i> gen bölgesine ait örnek elektroferogram.	58
ekil 13: Çalı mamıza ait spoligotiplendirme membranının görüntüsü	59
ekil 14: Spoligotiplendirmesi yapılan 52 su un dendogramı	60
ekil 15: Spoligofamilyaların pasta grafi inde gösterilmesi.	63
ekil 16: M X 1 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü	65
ekil 17: M X 2 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü	65
ekil 18: M X 3 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü.	66
ekil 19: M X 4 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü.	66
ekil 20: M X 5 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü	67
ekil 21: M X 6 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü	68
ekil 22: M X 7 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü	68
ekil 23: M X 8 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü	69
ekil 24: 52 su a ait MIRU-VNTR sonuçlarının dendogramı	70

TABLULAR

Sayfa no:

Tablo 1: MIRU lokusları ve kullanılan primer dizimleri	45
Tablo 2: MIRU-VNTR PZR amplifikasyon karı ımları	47
Tablo 3: MIRU lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve ampikon boyutları....	49
Tablo 4: 52 <i>M. tuberculosis</i> su unda <i>rpoB</i> geninde saptanan mutasyonlar	53
Tablo 5: INH Dirençli 52 <i>M. tuberculosis</i> su unda <i>katG</i> ve <i>inhA</i> genlerinde saptanan mutasyonlar	56
Tablo 6: 52 <i>M. tuberculosis</i> su unda saptanan sipoligotipler	61
Tablo 7 :Major Spoligofamilyaların da ılımı	62

G R

Tüberküloz, bilinen en eski hastalıklardan birisi olmakla beraber, enfeksiyöz etkenlere ba lı ölümlerin ilk sırada gelen sebebidir. Küresel çapta hastalı n önlenmesine ve kontrolüne yönelik tüm çabalara ra men hem geli mi hemde geli mekte olan ülkelerde halen önemli bir halk sa lı ı sorunudur. Çok ilaca dirençli (Ç D) tüberküloz sorunu dünyada giderek yaygınla maktadır. Iaca dirençli tüberkülozun küresel boyuta ula ması nedeniyle tüberkülozun epidemiyolojisi ve kontrol programları çok daha büyük önem kazanmaktadır (1,2).

Dünya Sa lık Örgütü (DSÖ) 2013 Raporu'na göre dünyada 2012 yılında tahmin edilen tüberkülozlu hasta sayısı 8.6 milyondur. Bu hastalardan 1.3 milyonunun öldü ü tahmin edilmektedir. Dünyada 2012 yılında bildirilen akci er tüberkülozu olguları arasında 450.000 Ç D tüberküloz olgusu oldu u tahmin edilmektedir. Türkiye'nin 2012 yılı tüberküloz mortalite hızı yüz binde 0.52; nokta prevalans hızı yüz binde 23; insidans hızı yüz binde 22 olarak bildirilmi tir. Toplam tüberküloz vaka sayısı 14.691'dir (2). Türkiye'de Verem Sava ı 2012 Raporu'na göre ilaç duyarlılık testi yapılan 4.965 olgunun 250'sinin (%5) Ç D tüberküloz oldu u bildirilmi tir (3).

Tüberkülozdan korunma; bula tırıcı hastaların tedavisi, koruyucu ilaç tedavisi, Bacillus Calmette Guarin (BCG) a ısı ve bula zincirinin kırılmasıyla mümkün olabilir. Enfeksiyon zincirini kırmak, kaynak ve bula yollarını saptamak için en de erli yöntemler moleküler epidemiyolojik yöntemlerdir (4,5).

Tüberkülozlu hastalardan izole edilen su ların moleküler tiplendirme yöntemleriyle tiplendirilmesiyle; tüberkülozda kaynak ve bula yolları tespit edilmekte, salgınlar saptanabilmekte, laboratuardaki çapraz kontaminasyonlar gösterilebilmekte, hastalı n yayılım dinami i ve özellikleri ortaya konabilmekte, reenfeksiyon ve reaktivasyon ayrımı yapılabilmekte, hastalı n toplum içinde yayılımı daha net anla lılmakta ve tüberküloz epidemiyolojisi hakkındaki bilgilerimiz artmaktadır (6-8).

Etkili tedavi protokolünün olu turulması ve kontrol önlemlerinin daha erken uygulanması için tüberkülozdan üphelenilen hastalarda *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) ayrımı ve ilaç direncinin hızlı ve do ru olarak saptanması son derece önemlidir. Geleneksel proporsiyon metodunda ilaç direnci en erken 4-6 hafta içinde saptanabilmektedir. Moleküler yöntemler bu süreyi 1-2 güne indirmekte ve Ç D tüberkülozun enfeksiyöz periyodunu 4-6 hafta kadar kısaltabilmektedir. Bu sayede Ç D tüberküloz olgularının daha fazla yayılması önlenebilmekte ve tedavi daha etkin olmaktadır (9).

Halk sa lı ı açısından büyük önem ta ıyan tüberkülozun toplum içerisindeki hızlı yayılımının nedenlerinin anla ılması ve daha etkili kontrol önlemlerinin geli tirilebilmesi için moleküler bazlı epidemiyolojik yöntemlerin yaygınla ması gerekmektedir. Dünyada son yıllarda tüberkülozun moleküler epidemiyolojisiyle ilgili çalı malardaki hızlı artışta kar ın, ülkemizde *M. tuberculosis*'in epidemiyolojik özelliklerini tespiti yönelik yapılan ara tırmalar sınırlıdır. Çalı mamızın amacı Türkiye'nin farklı merkezlerinden 2008-2010 yılları arasında toplanmı ve Türkiye Halk Sa lı ı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Ba kanlı ı Tüberküloz Ara tırma ve Uygulama Laboratuvarı stoklarında bulunan Ç D *M. tuberculosis* su ları arasındaki klonal ili kinin moleküler tiplendirme yöntemleriyle belirlenmesi, dirençten sorumlu mutasyonların ortaya konulması ve uygulanan tüberküloz tedavi kontrol programlarının etkinli i hakkında labaratuvara dayalı verileri ortaya koymaktır.

GENEL B LG LER

2.1. TAR HÇE

Tüberküloz, insanlık tarihinin en eski ve en korkulan hastalıklarından biridir. Verem hastalığına tarihsel süreçte halk tarafından, en önemli ölüm sebebi olduğu için “ Ölümün kaptanı ”, insanları eriterek öldürdüğü için “ Tüketim Hastalığı ”, “ Nce Hastalık ” ölenlerin birçoğunun soluk yüzü olmasından dolayı “ Beyaz ölüm ”, “ Beyaz Veba ” gibi isimler verilmiştir. Milattan Önce (M.Ö). 4000 ile 2400’lü yıllarda eski Mısırda Firavunlar döneminden kalma Thebus bölgesinde bulunan 85 mumyadan alınan organik materyallerde tüberküloz varlığı ispatlanmıştır ve epidemiyolojik moleküler yöntemlerle süspendirilmesi yapılabilmektedir. Hipokrat M.Ö. 460’lı yıllarda eski Yunan literatüründe tüberkülozu tanımlamıştır. Galen ise 2. yüzyılda ilk tedavi önerilerini belirtmiştir (10-12).

Padua Üniversitesinden Giovanni Battista Morgagni (1682-1771) tüberkülozun kavite ve skar dokusuna sebep olduğunu bildirmiştir, hastalığın bulaıcı olduğunu düşündüğü için tüberküloz hastalarına otopsi yapmamıştır. Rene Laennec (1781-1826) tüberkülozun bütün formlarını gün yüzüne çıkarmıştır veremin akciğerden başlıca karaciğer, dalak, böbrek gibi organlarda tüberküloz denilen kabarcıklara sebep olduğunu göstermiştir (10,12).

Robert Koch (1882) tüberküloz basilini önce balgamda bulmuş, sonra ölen bir hastanın akciğerindeki lezyonlarda basilini göstermiş ve tüberküloz basilini sıçan hayvanlara enjekte ederek onlarda hastalık geliştirmiştir. Wilhelm Conrad Röntgen’in (1895) X ışınlarını bulması, akciğer tüberkülozunun erken tanısında önemli faydaları olmuştur. Calmette ve Guerin patates-gliserin-safralı vasatta tüberküloz basilini üretilen 11 yıl boyunca 230 pasaj yaptılar. Elde edilen basiller kobaylara zerk edildi ve onlarda verem gelişti. Elde edilen basile Bacille Calmette Guerin adı verildi. BCG ilk defa 1921 yılında annesi veremden ölen sağlıklı bir bebekte denenmiştir. Çocukta verem gelişmemiştir ve hiçbir yan etki görülmemiştir. II. Dünya Savaşı’ndan sonra BCG yaygın olarak kullanılmaktadır. Florence B. Seibert 1939 yılında

old tüberkölünü safla tırmı ve safla tırılan bu protein türeyle tüberkölöz enfeksiyonunun varlı ı tespit edilmeye ba lanmı tır (10,12,13).

Tüberkölöz tarihinde kemoterapi dönemi 1944 yılında Selman Waksman tarafından streptomisinin (SM) ke fiyle ba lamı tır. Jorgen Lehman benzoik asit ve salisilik asitle *M.tuberculosis*'in oksijen tüketiminin engelledi ini görünce tedaviye Paraaminosalisilik asit (PAS) eklenmi tir. Tek ba larına kullanılan bu ilaçlara kar ı kısa sürede direç geli mi ve yeni ilaç çalı maları hız kazanmı tır. 1952 yılında INH' ın antitüberkölöz aktivitesinin bulunmasıyla INH, PAS, SM'den olu an, 18-24 ay süren üçlü tedavi rejimine ba lanmı ve tüberkölöz tedavi edilebilir hale gelmi tir. 1954 yılında prizinamid (PRZ), 1962 yılında etambutol (ETB), 1966 yılında RIF'in, bulunması ve tedaviye eklenmesiyle standart tedavi süreleri kısalmı tır (12-15).

2.2. MYCOBAKTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS' N

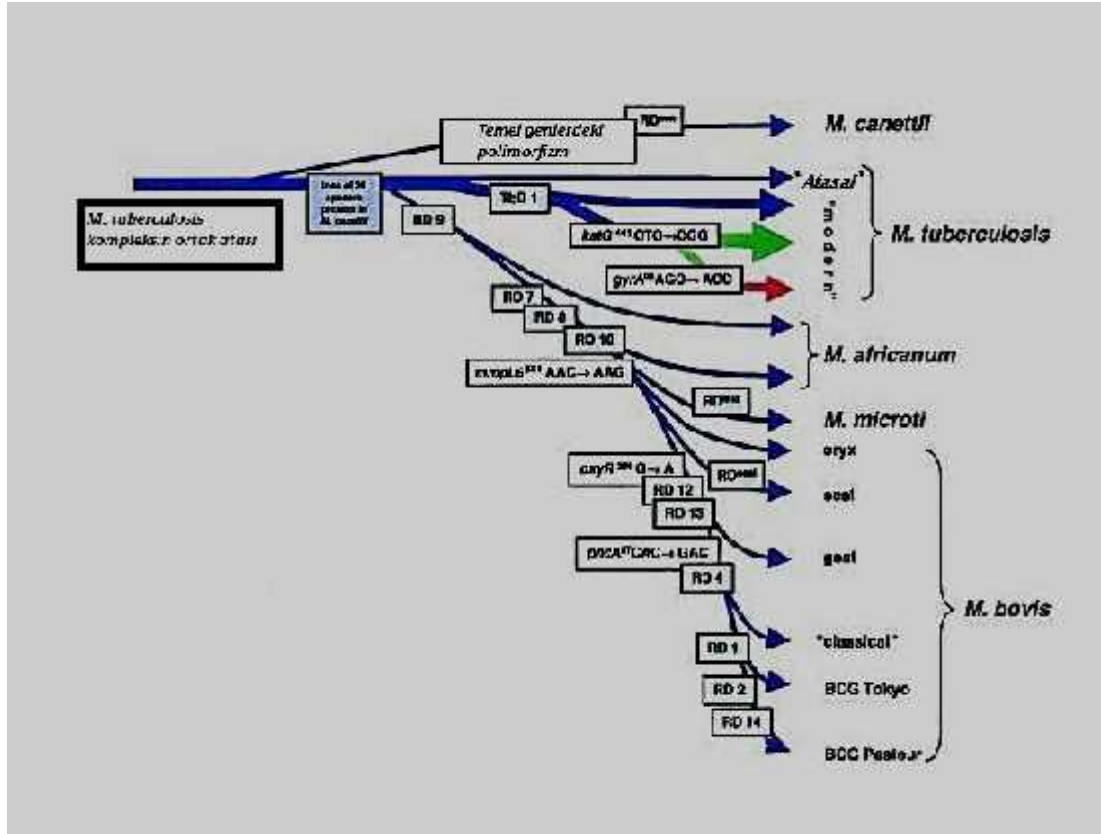
EVR MSEL GEL M

MTK; *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium caprae* türlerini kapsamaktadır. Verem hastalı ının en önemli etkeni *M. tuberculosis*'dir. Konak tropizmleri, fenotipik özellikleri ve patojeniteleri çok farklı olmasına ra men MTK üyeleri arasında çok yüksek düzeyde genetik homojenite vardır. 16S rDNA'ları tamamen aynı olmakla beraber MTK türleri nükleotit düzeyinde %99,9 benzerlik göstermektedirler. Mevcut bulgular tek bir atasal türün klonal soyundan türeyen *M. tuberculosis* kökenlerinin bütün dünyaya yayıldı ını dü ündürmektedir. *M. tuberculosis* kökenlerinde RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13 ve RD14 (*Region of difference*) delesyonu bulunmaması *M. tuberculosis*'i MTK'nın di er türlerinden farklı kılmaktadır. *M. tuberculosis*'in konak özgüllü ünden bu bölgelerin sorumlu olabilece i dü ünülmektedir. Bununla beraber *M. tuberculosis* kökenlerinin bir ço unda *M. tuberculosis*'e özgü TbD1 (*M. tuberculosis specific deletion 1*) delesyonu oldu u bilinmektedir (16).

M.tuberculosis'e özgü olan TbD1 bölgesi tüm *M.tuberculosis* su larında bulunmamaktadır. TbD1 bölgesini ta ıyan su ların atasal *M.tuberculois* su ları,

TbD1 bölgesinde delesyona u ramı su larında modern *M.tuberculosis* su ları olarak tanımlanması gerekti i ileri sürülmü tür. Atasal *M.tuberculosis* su unun MTK türlerinin atası oldu u dü ünülmektedir. Atasal *M. tuberculosis* su una son derece yakın olan *M. canettii* yalnız bu türe özgü RDcan mutasyonu nedeniyle Modern *M. tuberculosis* su larındaki delesyon olu madan önce atasal su ların mutasyonu ile ortaya çıkmı tır. TbD1 mutasyonu olmayan atasal *M.tuberculosis* su ları hiçbir delesyon ve mutasyona u ramamı tır. Atasal *M.tuberculosis* su unda TbD1 delesyonu olmadan önce RD9 ve ardından RD7, RD8, RD10, RD12, RD13, RD1, RD2, RD14 bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar sırası ile *M. africanum* > *M. microti* > *M. pinnipedii* > *M. caprae* > *M. Bovis* (ekil 1) subtiplerinin ortaya çıkmasına neden olmu tur (16,17).

Gelece e yönelik tüberküloz kontrol programlarının düzenlenmesi için MTK türlerinde yer alan su ların filogenetik özelliklerinin ve konakak mikroorganizma ili kilerinin belirlenmesi oldukça önemlidir (17).



ekil 1: *M. tuberculosis* kompleks türleri arasındaki filogenetik ili ki (kaynak 18 den modifiye edilmi tir).

2.3. EP DEM YOLOJ

DSÖ 2013 Küresel Tüberküloz Raporu'na göre dünyada 2012 yılında tahmin edilen tüberkülozlu hasta sayısı 8.6 milyondur (%13'ü HIV ile koinfekte). Bu hastalardan 1,3 milyonunun öldü ü tahmin edilmektedir. Ölen 1,3 milyon hastanın 320.000'i aynı zamanda Aids (Acquired immune deficiency syndrome) hastasıdır. Tüberküloz olgularının %80'i yüksek tüberküloz yüküne sahip 22 ülkede bulunmaktadır (Afganistan, Banglade , Brezilya, Çin, Endonezya, Etiyopya, Filipinler, Güney Afrika, Hindistan, Kamboçya, Kenya, Kongo Cumhuriyeti, Mozambik, Myanmar, Nijerya, Pakistan, Rusya Federasyonu, Tanzanya, Tayland, Uganda, Vietnam ve Zimbabve). Dünya genelinde insidans, prevalans ve mortalitenin en yüksek olduğu, tüberküloza bağlı ölümlerin %75'inin gerçekleştiği bölgeler Afrika ve Güney Doğu Asya Bölgeleridir (2).

DSÖ 2013 Küresel Tüberküloz Raporunda Türkiye'nin 2012 yılı tüberküloz mortalite hızı yüz binde 0.52; nokta prevalans hızı yüz binde 23; insidans hızı yüz binde 22, vaka bulma hızı yüzde 87 olarak bildirilmiştir. Toplam tüberküloz vaka sayısı 14.691'dir. Hastaların %92'si (13.535) yeni tüberküloz olgusu, %8'i (1.156) önceden tedavi görmüş olgulardır. Avrupa bölgesinin 2012 yılı tüberküloz mortalite hızı yüz binde 3.9; nokta prevalans hızı yüz binde 56; insidans hızı yüz binde 40'dır. Dünya genelinin 2012 yılı tüberküloz mortalite hızı yüz binde 13; nokta prevalans hızı yüz binde 169; insidans hızı yüz binde 122 olarak bildirilmiştir. 1990 yılından bugüne tüberküloz mortalitesi %45, prevalans %37 azalmıştır (2).

Türkiye Verem Savaşı 2012 Raporu'na göre toplam 16.551 tüberküloz hastası 2010 yılında verem savaşı dispanserleri kayıtlarında yer almıştır. Hastaların 9.841'i (%59,5) erkek, 6.710'u (%40,5) kadınlardan oluşmaktadır. Olgu hızı erkeklerde yüz binde 26,6 ve kadınlarda yüz binde 18,3 olarak bildirilmiştir. Olgu hızı, 15-24 yaş grubundan itibaren yükselmekte, 65 ve üzeri yaşlarda en yüksek seviyeye (yüz binde 39,4) ulaşmaktadır. Yeni olguların oranı %91,7 (15.183) iken önceden tedavi görmüş olguların oranı %8,3 (1.368) olarak bildirilmiştir. Önceden tedavi görmüş hasta oranları; nüks %6,5 (1.070), tedaviyi terketen %1,1 (185), tedavi başarısızlığından gelen %0,5 (84) ve kronik olgudur %0,2 (3).

DSÖ 2013 Küresel Tüberküloz Raporu'na göre dünyada 2012 yılında bildirilen akci er tüberkülozu olguları arasında 450.000 Ç D tüberküloz olgusu oldu u tahmin edilmektedir. 27 ilaç direnci yüksek ülke surveyans verilerine göre, yeni olguların % 3.6'sı ve önceden tedavi alan olguların %20.2'si Ç D tüberküloz olgularıdır. Türkiye'de Verem Sava ı 2012 Raporu'na göre ilaç duyarlılık testi (DT) yapılan 4.965 hastanın 250'sinin (%5) Ç D tüberküloz oldu u tespit edilmi tir. Ç D tüberküloz oranı yeni olgularda %2.5 iken, daha önceden tedavi görmü hastalarda %22.8 olarak belirlenmi tir. 2012 yılında 450.000 Ç D tüberküloz hastasının 170.000'i ölmü tür (2,3).

DSÖ' nün tüberkülozla mücadelede hedefleri, 'tüberküloz prevalansını 2015 yılına kadar 1990 yılına kıyasla yarıya dü ürmek, yeni yayma pozitif akci er tüberküloz hastalarının en az %70'inin kalite kontrollü bakteriyolojik muayene ile tespit edilmesi ve yeni yayma pozitif akci er TB hastalarının en az %85'inin ba arı ile tedavi edilmesidir'. Türkiye'de Verem Sava ı 2011 Raporu'na göre Türkiye'nin 1990 yılında yüz binde 52 olan tüberküloz nokta prevalansı 2006 yılında yüz binde 26'ya dü ürülmü ve prevalans hedefine ula ılmı tır. 2005 yılında yeni yayma pozitif akci er TB hastalarının %82'si tespit edilmi , 2004 yılında hastaların %85'inde tedavi ba arısı sa lanmı ve bu hedeflere de ula ılmı tır (19).

2.4. MYCOBAKTERIUM TUBERCULOSIS' N BAKTER YOLOJ K KARAKTER

2.4.1. Sınıflandırma:

Mikobakteri ailesinin ilerleyen laboratvuar teknolojileriyle birlikte günümüzde tanımlanmı 130'dan fazla üyesi bulunmaktadır. Patojen, patojen olmayan, fırsatçı mikobakteriler olmak üzere üç grupta incelenirler. *Mycobacterium* cinsi, Prokaryot aleminin, *Firmicutes* bölümünün, *Actinobacteria* sınıfının, *Actinomycetales* takımının, *Mycobacteriaceae* ailesine üyedir. DNA benzerlikleri ve bakteriyolojik özellikleri bakımından birbirleriyle yakın ili kili olan türler kompleks ba lı ı altında gruplandırılırlar. DNA hibridizasyon çalı malarında MTK içindeki türlerin DNA homolojisinin %85-100 oranında de i ti ini ortaya koymu , restriksiyon

endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan ara tırmalarda benzer sonuçlar alınmıştır. Tüberküloz hastalarından günümüzde en sık izole edilen tür *M. tuberculosis*'dir. *M. tuberculosis*, MTK üyelerinden birisidir. MTK üyeleri içindeki türler *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*'dir (20-22).

2.4.2. Bakteriyolojik Özellikler:

M. tuberculosis sporsuz, hareketsiz, silindirik eklemlerde, uçları yuvarlak, 0.2- 0.6 µm eninde, 1-10 µm boyunda düz veya hafif kıvrık, ince, zorunlu aerobik bir basildir. *M. tuberculosis* aerobik solunumda son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanır. İçin özellikle akciğerin üst loblarda en iyi üreyebildiği vücut bölgeleridir. Kültür ortamında oksijen miktarındaki azalma üreme hızında kayda değer bir düşüme neden olur. Ortamda %5-10 karbondioksit bulunması üremeyi artırırken, üreme için optimal ısı 37°C, optimal pH 7'dir. *M. tuberculosis*'in ikiye bölünme süresi 15-20 saat olup, yavaş üreyen bir bakteridir. Bu sebeple tüberküloz kolonilerinin katı besiyerinde görülebilmeleri için en az iki hafta geçmesi gerekmektedir. *M. tuberculosis*'in besiyerinde ürerken oluşturduğu hidrojen peroksit ve diğer toksik oksijen radikalleri bakterinin katalaz-peroksidaz enzimi tarafından etkisiz hale getirilir. Bu sayede toksik radikallerin uzun inkübasyon süresince tüberküloz basiline zarar vermesi engellenir (20,21).

Tüberküloz basilinin hücre duvarı diğer bakteri hücrelerinden farklı olarak yüksek oranda lipid içerir ve çok daha kalındır. Tüberküloz basilinin hücre duvarı plazma membranı, orta tabaka ve peptidoglikan olmak üzere üç tabakadan oluşan kompleks bir yapıdadır. Plazma membranı iç tabakası hidrofobik, dış tabakası hidrofilik özellik gösteren iki tabaka fosfolipid içerir. Plazma membranının başlıca görevleri osmotik korunma ve iyonların transportudur. Basilin hücre duvarının orta tabakasında peptidoglikan, arabinogalaktan, mikolik asitler, açıl trehalozlar, polisakkarit içeren lipitler, fosfatidilinozitolün glisikozil derivatları bulunmaktadır. Tüm hücre duvarının kuru ağırlığının %50'sini, hücre lipitlerinin %60'unu mikolik asitler oluşturur. Hücre duvarının en önemli komponenti kemotip IV peptidoglikan yapısıdır. Peptidoglikan yapı kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere disakkarit fosforil köprü ile bir heteropolisakkarit olan arabinogalaktanı kovalent olarak bağlar.

Hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandıran bakteriye eklini veren yapı peptidoglikan tabakadır (23). Arabinogalaktan tabakası polisakkaritlerden oluşur ve mikolik asitlerle peptidoglikan yapı arasında köprü görevi görür. Mikolik asit, arabinogalaktan ve peptidoglikandan oluşmuş bu güçlü yapı bir zırh gibi mikobakteri hücrelerini çevreler. Lipoarabinomannan, mannosfosfoinositid, serbest lipid ve polipeptidlerinde eklenmesiyle bu yapının kuvveti daha da artar. *M. tuberculosis*'in fiziki bütünlüğüyle beraber hücre duvarındaki mikolik asit ve lipid bariyer sistemi bu bakteriye asit dirençli boyanma özelliğini kazandırmıştır. *M. tuberculosis*'in gram boyanma özelliği yoktur. Mikobakterilerde boyanın hücre duvarını geçerek mikobakteri hücresi içine girebilmesi için ısı gibi faktörlerin kullanılması gerekmektedir (20,21,23-25).

M. tuberculosis'in içeriğini kalın hücre duvarı birçok ilaç molekülünün hücre içine geçmesini engelleyerek doğal bir direnç mekanizması oluşturmaktadır. *M. tuberculosis* tedavisinde kullanılacak olan ilaçlar öncelikle bu tabakadan kolaylıkla geçebilmelidir. *M. tuberculosis* hücre duvarının hidrofobik ve permabilitésinin düşük olması nedeniyle; hidrofilik antibiyotikler, metal iyonları, kimyasal toksik ajanlar, oksijen radikalleri gibi hücresel toksinlere karşı intrinsek dirence sahiptir (21,26).

M. tuberculosis'in yapısında yer alan protein, lipid, polisakkaridlerin tamamı immünojeniktir. Bakterinin bu komponentleri immünsüpresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşumu, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu, gibi çok farklı etkilere sahiptir. Hücresel immün sistem mikobakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda kilit rol oynadığı için proteinler anahtar immünojenler olarak kabul edilmektedir. Robert Koch tarafından bulunan old tüberkülin tüberküloz basilinin kaynatılmış kültür ekstraktıdır. Bir dönem intradermal cilt testinde kullanılmış fakat sadece mikobakteriyel proteinler içermemesi, başka komponentlerde içermesi sebebiyle saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Old tüberkülinin saflaştırılmasıyla elde edilen saflaştırılmış protein derivativesi (PPD) ilk kez Seibert ve Glen tarafından 1941 yılında tanımlanmıştır ve DSÖ'nün önerisiyle tüberkülin deri testinde kullanılmaktadır. Diğer mikobakteri türleriyle oluşan enfeksiyonlarda çapraz reaksiyonlara sık rastlanması ve tam olarak

safla tırlamamı olması gibi istenmeyen özelliklerine rağmen PPD halen immüendiagnostik önemini korumaktadır (20,27,28).

2.4.3. Virülans

M. tuberculosis'in virülansında rol alan kesin bir faktör gösterilememekle beraber yapılan çalı malar kord faktör ve sülfatidler gibi bazı immünoreaktif komponentlerin virülansdan sorumlu olabilece ini ortaya koymu tur. Bakterinin histolitik enzimleri, endotoksinleri veya eksotoksinleri bulunmamaktadır. Mikobakteriler spor olu turamazlar. Latent dönemde spor gibi metabolik olarak inaktiftirler fakat aktif forma dönü ebildikleri kabul edilir (20,29).

Trehaloz-6,6'-Dimikolat (Kord Faktör): Tüberküloz basillerine küme olu turma özelli i kazandırmasından dolayı kord faktör olarak da isimlendirilen trehaloz dimikolat sadece virülan su larda bulunan önemli bir virülans faktördür. Konak hücrede mitokondri membranına ba lanarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasara neden olu r, polimorfonükleer lökosit göçünü inhibe eder, granülom olu masında rol alır (20,21,28).

Polisakkaritler (Arabinogalaktan, Arabinomannan): Nötrofillerin damardan dokuya geçerek yangısal tepkime olu masını sa larlar, konak hücre makrofajlarından TNF- salınımını indüklerler (20).

Sülfatidler (Sülfolipidler) : Sülfür içeren, kord faktörün toksik etkisine sinerjik yanıt veren glikolipidlerdir. Bakteriyi lizozomal enzimlerin etkisinden makrofajda fagozom-lizozom füzyonunu önleyerek korur (20).

Fosfotidler: Epitel hücrelerinin dev hücrelere dönü mesine sebep olarak tüberkül olu umunda rol alır (20).

Fosfatidil nositol Mannosid: Çapraz koruyucu immünitede rol aldı ı dü ünülen, haptenik, lipid yapıdır (20).

Wax D: BCG a ısının bazı tümörlerde gerileme gösteren immunoteropatik etkisi olan peptidoglikolipid yapıdır. Freund's adjuvanının etkisini artırır (20).

2.4.4. Patogenez

Tüberküloz basilleri insan vücuduna solunum, sindirim, deri, genitoüriner sistem gibi farklı bölgelerden girebilir fakat en önemli bula yolu inhalasyondur. Bula sonrası enfeksiyonun olup oluşması *M. tuberculosis*'in virülansından çok konakçının immün savunma yeteneğine bağlıdır. Hem doğal hem de kazanılmış immünite konakçının tüberküloza karşı yanıtında rol almaktadır (20,30,31).

Akciğer tüberkülozlu hastaların sekresyonları sonucu oluşan damlacık çekirdeklerinin sağlıklı bireyler tarafından solunmasıyla tüberküloz bulaşı gerçekleşir. İçinde 1-3 basil bulunduran 1-5 mikron çapındaki damlacıklar kolaylıkla akciğer alveollerine ulaşabilir. Alveollere ulaşan basil alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilir. Alveolar makrofajların bu dönemde mikrobiyosidal etkileri ve proinflamatuar dirençleri güçlü olmadığından basillerin bir kısmı antijenik parçalara ayrılırken, bir kısmı bütünlüğü bozulmadan canlı kalır (20,30,31). Alveolar makrofaj içinde bulunan canlı basiller çoğalıp makrofajları parçalayarak alveolar boşluğa geçerler. Makrofajların yıkımı sonucu açığa çıkan kemokinler monosit ve lenfositlerin lenfositler bölgesine toplanmasını sağlayarak granülom oluşumuna katkı sağlarlar. Alveolar boşluğa geçen basiller yeni makrofajlar tarafından fagosite edilseler bile hücrel immün yanıt gelişmediği ve makrofajlar henüz aktive edilmediği için çoğalmaya devam ederler ve lenfohematojen yolla tüm vücuda yayılarak yeni granülomlar oluştururlar (30,32).

M. tuberculosis'in inhalasyonundan 2-6 hafta sonra hücrel immünite gelişir. T lenfositlere tüberküloz antijenlerinin sunulmasıyla T lenfositlerden açığa çıkan sitokinler, makrofajların sayıca artmasını ve fonksiyonlarının güçlenmesini sağlarlar. Bu süreçte gelişen diğer immünolojik yanıt gecikmi tip 1 duyarlılık reaksiyonudur. Gecikmi tip 1 duyarlılık reaksiyonu kazifikasyon, lififikasyon, kaviteye sebep olur. Böylece basil çoğalması durur, basiller solid kazeöz dokuya geçer ve granülom merkezinde kazeöz nekroz alanları oluşturulur. Kazeöz nekroz alanları içinde basiller ömür boyunca dormant olarak kalabilirler. Enfeksiyon burada sınırlanırsa, primer enfeksiyon evresi tamamlanmış olur. Hastanın kendi savunma mekanizması için hücrel immünite yararlı olurken, gecikmi tip 1 duyarlılık reaksiyonu basillerle birlikte çevre dokularında da, nekroz ve kaviteye yol açarak

zararlı olmaktadır. Basillerin ilk lezyon yerinde veya lenfohematojen yolla yayıldıkları bir organdaki odakta olu an erime ve onu takip eden aktivasyonla olu an enfekte ki ilerinin %5'inde ya amlarının herhangi bir döneminde olu an hastalık postprimer tüberküloz veya reaktivasyon tüberkülozu olarak tanımlanmaktadır (30,32).

2.4.5. Klinik Tablolar:

Primer Tüberküloz: nhalasyonla alınan basil, kona ın ilk savunma mekanizmasını yenersen primer enfeksiyon meydana gelir. Primer enfeksiyon hücresel immün yanıt tarafından durdurulursa hastalık geli mez. Kona ın immün yanıtı yeterli de ilse primer odaktaki ve ilgili lenf bezlerinde inflamasyon ilerler ve klinik olarak belirginle en primer tüberküloz meydana gelir (20).

Milier Tüberküloz: Primer enfeksiyon esnasında kazeöz bir oda ın kom u kan damarına açılması veya damar duvarına yerle en basillerin kana karı masıyla karakterize tablodur. Genellikle 0-4 ya arasındaki immün sistemi zayıf olan çocuklarda primer enfeksiyonun erken komplikasyonu ekinde meydana gelir (20).

Sekonder Tüberküloz: Eri kin tipi tüberküloz, bronkojen tüberküloz, postprimer tüberküloz gibi isimlerle de anılan bu hastalık formu iki ekinde geli ebilir (20).

a.Endojen Reaktivasyon: Hücresel immün yanıtta meydana gelen supresyon nedeniyle primer enfeksiyondan sonra dokularda dormant kalan basillerin herhangi bir dönemde aktif hale geçmesiyle olu ur (20).

b.Ekzojen Reinfeksiyon: Daha önceden primer enfeksiyon geçirmi bireylerin aktif tüberküloz basili yayan bir hastadan çok sayıda virülan basil almasıyla geli en hastalık eklidir (20).

Ekstrapulmoner Tüberküloz: Tüberküloz basili iyi oksijenlenen organ ve dokulara yerle ip, hastalık olu turma e ilimindedir. Bundan dolayı tüberküloz akci erlerden sonra sırasıyla seröz zarlar, böbrek, kemik-eklemler, lenf bezleri, larenks, genital sistem, barsak ve di er organlarda görülür (20).

2.5. ANT TÜBERKÜLOZ İLAÇLAR ve D İRENÇ MEKANİZMALAR

Tüberküloz tedavisi birinci ve ikinci seçenek ilaçlarla yapılmaktadır. Birinci seçenek ilaçlar INH, RIF, ETB, PRZ, SM'dir. Etionamid, sikloserin, amikasin, kanamisin, kapreomisin, tiasetozon, paraamino salisilik asit, ofloksasin, rifabutin, klofazamin gibi ilaçlar ikinci seçenek ilaçlardır. İkinci seçenek ilaçlar, birinci seçenek ilaçlara göre daha toksik ve daha zor tolere edilebilen ilaçlardır (33-35).

Primer direnç; ilaç tedavisi almamış veya bir aydan kısa sürede ilaç tedavisi almamış tüberküloz olgularında saptanan dirençtir. *Sekonder direnç*; uygun olmayan tedavi rejimlerinin kullanılmasına bağlı olarak dirençli mutantların artması nedeniyle gelişen dirençtir (35,36).

Antibiyotiklerin hatalı kullanımı sonucunda ilaca dirençli suşlar meydana gelmektedir. Sadece bir antibiyotik ile dirençli hastalığa tek ilaca dirençli tüberküloz, aynı anda içerisinde INH ve RIF bulunmayacak şekilde minimum iki birinci basamak anti tüberküloz ilacın bulunduğu kombinasyonlara karşı gelişen direnç durumuna birden çok ilaca dirençli tüberküloz denir. Çoklu tüberküloz, diğer anti tüberküloz ilaçların duyarlılık durumuna bakılmaksızın basilin aynı anda INH ve RIF'e dirençli olma durumudur. Yaygın ilaca dirençli tüberküloz, tüberküloz basilinin INH ve RIF direncine ilave olarak ikinci seçenek anti tüberküloz ilaçlardan herhangi bir florokinolona ve parenteral kullanılan ilaçlardan en az birine karşı gelişen direnç durumudur (1,37).

Tüberküloz basillerinde plazmitlere bağlı veya bakteriler arası gen transferi yoluyla direnç gelişimi söz konusu değildir. Direnç, kromozomal spontan mutasyonlara bağlı olarak veya basilde doğuştan olarak direnç genlerinin varlığıyla gelişmektedir. Doğuştan olarak basilin dirençli olma ihtimali RIF için 10^{-8} , INH ve ETB için 10^{-6} , SM için 10^{-5} 'tir. İlaç direnci; hücre içine ilacın alınmasının azalması, artmış eflüks, hedef molekülde meydana gelen defektlik, ön ilaçların etkin hale dönüşümünü sağlayan enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen azalma ve hedefin artırılmasıyla meydana gelmektedir. Yüksek oranda bulunan dirençli basiller hatalı tedavi rejimleri nedeniyle çoğalmakta ve ilaçların etkisiz kalmasına sebep olmaktadır (37,38).

2.5.1. zoniazid:

Ön ilaç olan INH mevcut antitüberküloz ilaçların en güçlüsüdür. Dormant basilleri üzerine bakteriyostatik, hızla ço alanlar üzerine bakterisit etkili bir ilaçtır. Kazeöz lezyonlar ve makrofajlar içine girebilir, iyi absorbe olur. Hücre içine alınan INH, peroksidazın etkisiyle izoniazid hidrazin ve izonikotinic asite dönüür. zonikotinic asit bakteride nikotinic asitin antimetaboliti olarak görev yapıp koenzim A sentezini bozar ve hücre içinde hidrojen peroksit yıkılamaz. Hidrojen peroksit DNA ve lipitler gibi pek çok molekülde hasar olu turarak bakteride letal etki yapar (34,39,40). INH direncine, *katG*, *inhA*, *kasA*, *mabA*, *ndh* gen bölgelerindeki mutasyonlar neden olabilmektedir. *katG* geninde olu an mutasyonlar INH direncinin en önemli sebebidir. *katG* geninde olu an mutasyonlar katalaz, peroksidaz enzimlerinin kaybına neden olur ve ilaç hücre içine alınamayıp aktif metabolitine dönüemez. *katG* geninde en fazla saptanan mutasyon Ser315Thr mutasyonudur (41,42).

2.5.2. Rifampisin:

Yarı sentetik, hem hücre içi hem de hücre dı ındaki basillere bakterisidal etkili bir ilaçtır. Hızla ço alan ve dormant durumdaki basillere etkili olabilmektedir. Ribonükleik asit (RNA) polimerazın *B* alt ünitesine ba lanarak RNA sentezini inhibe eder. Etki gücü bakımından INH'a en yakın ilaç olup yan etkileri daha azdır (34, 39,43). RIF dirençli basillerin %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin *B* alt ünitesini kodlayan 81 baz çifti uzunlu undaki bölgede (resistance determining region) mutasyonların oldu u gösterilmi tir. Mutasyonlar en fazla 531, 526, 513, 516. kodonlarda saptanmaktadır (34,42,44).

2.5.3. Prizinamid:

Monosit ve makrofajlar içindeki yava ço alan mikobakteriler üzerine en etkili, sentetik yapıda bakterisidal bir ilaçtır. Hücre içinde basilin üretti i pirazinamidaz enzimiyle pirazinoik asite dönüerek etkisini gösterir. Dirençli basillerin %72-94'ünden pirazinamidaz enzimini kodlayan *pncA* en bölgesindeki mutasyonlar sorumludur (34,39,42,44).

2.5.4. Streptomisin:

Aminoligozit grubundan tüberküloza karşı etkin olduğu gösterilen ilk ilaçtır. Ribozomların ribozomal S12 proteini ve 16SrRNA alt grubuna bağlanarak ribozom fonksiyonlarını etkiler ve protein sentezini inhibe eder. *M. Tuberculosis*'in dirençli kökenlerinde %65-80 iki tip mutasyon saptanmıştır. Dirençten sorumlu mutasyonların çoğu Ribozomal S12 proteinini kodlayan *rpsL* genindeki nokta mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. *rpsL* genindeki nokta mutasyonlar yüksek düzeyde ilaç direncine neden olmaktadır. 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* genindeki nokta mutasyonlarsa orta düzeyde ilaç direncinin sorumlusudur (39,40,45).

2.5.5. Etambutol:

Birinci seçenek ilaçlara artan direnç sebebiyle geliştirilmiş, sentetik yapıda bakteriyostatik bir ilaçtır. Arabinozil transferaz enzimini inhibe ederek arabinogalaktan ve lipoarabinomannan'ın hücre duvarına taşınmasını önler. *embB* geninin 306. kodonunda oluşan Met306Val, Met306Leu ve Met306Ile mutasyonları en sık karşılaşılan mutasyonlardır. Met306Val, Met306Leu mutasyonu yüksek düzeyde, Met306Ile mutasyonu ise düşük düzeyde ilaç direncine yol açmaktadır (39,42).

2.6. DİRENÇİN SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Antitüberküloz ilaçların hatalı kullanımları sonucunda ilaçlara dirençli suşlar ortaya çıkmaktadır. İlaçlarla karşılaşılan tüberküloz basilleri klinik olarak dirençli deildir. Tüberküloz kontrol programlarının başarısının değerlendirilmesi için antitüberküloz ilaç direncinin surveyansı önemli bir yöntemdir. Duyarlılık testlerinin düzenli olarak yapılmaması tüberküloz insidansının yüksek olduğu ülkelerde önemli sorunlardan biridir. Duyarlılık testlerinin hastaya ait ilk *M. tuberculosis* izolatu için ve kültürü pozitif iki ay tedavi almış hastalara yapılması önerilir. *M. tuberculosis* duyarlılık testi için National Committee For Clinical

Laboratory Standarts (NCCLS) ba langıçta INH, RIF, PRZ, ETB'nin test edilmesini, basil RIF veya herhangi iki ilk seçenек ilaca dirençli bulunursa sekonder ilaçlara duyarlılık testi yapılmasını önermi tir (46).

2.6.1. Fenotipik Yöntemler

Antitüberküloz ilaçlara en güvenilir ve en hızlı yöntemi bulmak için çok sayıda duyarlılık yöntemi geli tirilmi tir. Mutlak konsantrasyon, direnç oranı ve proporsiyon yöntemleri gibi klasik yöntemler uzun süreden beri kullanılmaktadır. Standardizasyon zorlukları, yo un emek gerektirmeleri nedeniyle direnç oranı ve mutlak konsantrasyon yöntemleri sınırlı merkezlerde çalı labilmi tir. Proporsiyon yöntemiye katı besiyerlerinin kullanıldı ı duyarlılık testleri arasında en çok uygulanan yöntemdir (47-49).

Hiç ilaçla kar ıla mamı mutasyon içermeyen klinik izolatların %95'ini inhibe eden, tedaviye yanıt vermeme hastalardan elde edilen izolatlara ise etki etmeyen en dü ük konsantrasyon ilacın kritik konsantrasyonudur (50).

2.6.1.1. Proporsiyon Yöntemi:

Tüberküloz duyarlılık testi proporsiyon yöntemi ile direkt ve indirekt olarak uygulanabilir. Direkt yöntemde; mikroskobisinde aside dirençli bakteri görülen klinik örneklerde homojenizasyon, dekontaminasyon, konsantrasyon i lemleri sonrasında ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekim yapılır. Direkt yöntem ilaç direncinin yüksek oldu u bölgelerde inokulumun üremesi için geçecek olan süreden zaman kazandırır. ndirekt yöntemde ise; saf kültür halinde üremi basiller izole edilip inokulum hazırlanarak ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekim yapılır. Besiyerinden alınan koloniler cam boncuklu tüplerde ezilerek homojenize edilir. McFarland No:1 standart bulanıklı na göre tüplerdeki süspansiyonlar hazırlanır. laçlı ve ilaçsız besiyerlerine 10^{-2} ve 10^{-4} dilüsyonlar hazırlanarak 0.1 ml ekim yapılır. Lowenstein Jensen (LJ) ile proporsiyon yöntemi ekimden dört hafta, agar proporsiyon yöntemi ise üç hafta sonunda de erlendirilir. laç içeren besiyerindeki koloni sayısı, ilaç içermeyen besiyerindeki koloni sayısının %1'ine e it veya daha fazlaysa dirençli olarak rapor edilir. Direnç saptanmasında referans olan yöntemdir (48-50).

2.6.1.2. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi:

Örnekteki basil miktarı 2×10^3 veya 1×10^4 CFU/ml olan mikobakteri solüsyonu hem belirli konsantrasyonlarda ilaç içeren hem de ilaçsız kontrol besiyerine ekimi yapılır. Farklı ilaç konsantrasyonlarıyla çalışılıp üreme olmayan besiyerindeki ilaç konsantrasyonu o suyun Minimum inhibitör konsantrasyon (M K) de eri olarak kabul edilir (48-50).

2.6.1.3. Direnç Oran Yöntemi:

Antitüberküloz ilaçların hepsine duyarlı olduğu bilinen standart H37Rv suyu ile duyarlılığı araştırılan *M. tuberculosis* suyunun karşılaştırılması prensibine dayanır. Duyarlılığı test edilen *M. tuberculosis* suyu farklı konsantrasyonlarda ilaç içeren besiyerlerine ekilerek M K de erleri belirlenir. Duyarlılık testi yapılan suyun M K de eri, standart H37Rv suyunun M K de erinin 8 katı veya daha fazlaysa dirençli, 2 ve altındaysa duyarlı olarak rapor edilir (48-50).

2.6.2. Direncin Saptanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler

M. tuberculosis'de ilaç direncinin hızlı saptanmasına yönelik moleküler yöntemleri kullanma çalışmaları ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıyla başlamıştır. Klasik antibiyotik duyarlılık testleri haftalarca zaman alırken, moleküler yöntemlerle çok daha kısa sürelerde sonuç alınabilmektedir. Moleküler yöntemlerin bir kısmıyla kültüre gerek kalmadan doğrudan klinik örnekten yapılan uygulamalarla ilaç direnci saptanabilmektedir. Pahalı olmaları, klinik olarak dirence yol açan bakteri grubu içindeki dirençli suşların duyarlılara oranının tam olarak belirlenememesi, saptanması olan mutasyonların her zaman ilaç direnciyle ilişkili olmaması moleküler yöntemlerin en büyük dezavantajlarıdır. İmmünsüprese hastalarda, dirençli tüberküloz şüphesi olan hastalarda, ilaç duyarlılık sonucuna göre tedavisi yeniden düzenlenecek hastalarda, kaynağın dirençli tüberküloz basili olduğu düşünülen hastalarda moleküler yöntemlerle direnç tespiti faydalıdır. İlaç direncinden sorumlu mutasyonların saptanmasında kullanılan moleküler yöntemlerin çoğunda üç basamak vardır. İlk olarak klinik örnekten nükleik asit ekstraksiyonu yapılarak DNA elde edilir. Gendeki dirençten sorumlu hedef bölge amplifiye edilir. Son olarak çoğaltılan gen bölgeleri üzerindeki mutasyonlar saptanır (9,51).

2.6.2.1. Katı Faz Hibridizasyon Yöntemleri:

Ters hibridizasyon esasına dayan bu yöntemlerle nitrosetülöz erit üzerine yerle tirilmi özgül problar yardımıyla, biyotinle i aretlenmi primerlerle ço altılan mutasyonlarla ili kili gen bölgeleri saptanmaktadır. Normal ve mutant gen bölgelerine özgül diziler problar üzerinde bulunmaktadır. Mutant dizileri ta ıyan problara dirençli kökenler, normal dizileri içeren problara duyarlı kökenler ba lanır. Ticari kitleri bulunan bu yöntemin hızlı, duyarlı, özgül olması ve olanakları sınırlı laboratuvarlarda bile uygulanabilmesi en önemli avantajlarıdır. Yeni mutasyonları saptayamamaları, sessiz ve nötral mutasyonları saptayarak yanlı pozitif sonuçlar elde edilmesi önemli dezavantajlarıdır (52,53).

2.6.2.2. DNA Microarray:

Bu yöntem farklı çok sayıda mutasyonların saptanmasına olanak sa lamaktadır. Floresanla i aretli polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile elde edilmi amplikonların küçük bir chip üzerine ba lanımı çok sayıda oligonükleotid probla hibridize olması esasına dayanmaktadır. Optik tarayıcı ile olu an sinyaller saptanarak bilgisayar sisteminde de erlendirilir. Klinik örnekten bakterinin saptanabilmesi, tür tayininin yapılabilmesi, ilaç direncinin ara tırılması yöntemin en önemli avantajlarıdır (53).

2.6.2.3. Multipleks Alel Spesifik PZR:

Alel spesifik primerler kullanılarak *rpoB* genindeki 516, 526, 531. kodonundaki mutasyonlar ve *katG* geninin 315. kodonundaki mutasyonlar ara tırılmaktadır. Ara tırılan kodonda mutasyon yoksa DNA amplifikasyonu gerçekte irken, mutasyon varlı ında DNA amplifikasyonu gerçekte memektedir (54).

2.6.2.4. Heterodubleks Analizi:

ilaç direncine neden olan gen bölgesi, hem klinik örnekten izole edilen *M. tuberculosis*'ten, hem de duyarlı oldu u bilinen *M. tuberculosis* su undan amplifiye edilir. Bir tüp içerisinde amplifiye ürünler e it miktarda karı tırılıp ısıtılarak DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması daha sonra oda sıcaklı ına so utularak zincirlerin yeniden birle mesi sa lanır. Klinik örnekte mutasyon varsa heterodubleksler arasında

e le me bozuklu u olacak, DNA'nın çift sarmal yapısı bozulacaktır. Mutasyon varlı ında DNA' nın jel elektroforezinde birden fazla bant gözlenecektir (52,55).

2.6.2.5. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP):

laç direncinden sorumlu gen bölgesi PZR ile ço altılır. Çift zincirli DNA ısıtılarak denatüre olması sa lanır. Olu an tek zincirler içerdikleri nükleotit dizisine göre kıvrılmalar ve özgül yapı olu turur. Zincirin özgül yapısı elektroforez sırasında jel gözeneklerinden geçi hızını etkiler. Klinik örnekten elde edilen SSCP, duyarlı oldu u bilinen kontrol su uyla kar ıla tırıldı ında farklılı ın saptanması o gende bir mutasyon oldu unu ortaya koyar (52).

2.6.2.6. Gerçek Zamanlı PZR:

Aynı kapalı sistem içinde amplifikasyon, hibridizasyon, analiz i lemlerin yapıldı ı bu yöntemde DNA izole edildikten 1.5-2 saat içinde RIF ve INH dirençli su ların hepsi do ru olarak belirlenmektedir. Bu yöntemle RIF direnciyle birlikte yüksek seviyede INH direncide saptanabilmektedir. Gerçek zamanlı hibridizasyon problemlerinden RIF direncini ara tırılmasında yararlanılmaktadır (56).

2.6.2.7. Direncin Saptanmasında Sekans Analizi:

DNA dizi analizi tekniklerinin, yirminci yüzyılın ikinci yarısında bulunması moleküler biyoloji alanında devrim yaratmıştır. Sanger'in zincir sonlandırma temeline dayanan dizi analizi ve pyrosequencing yöntemleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sanger'in zincir sonlandırma yöntemi otomatize sistem ve manuel olarak uygulanabilmektedir. DNA dizi analizi referans yöntemidir. Otomatize sistemlerin kullanıma girmesiyle birlikte DNA dizi analizi yöntemi geni kullanım alanları bulmu tur. Bakteriyoloji laboratuvarlarında DNA dizi analizi en çok mikobakteriler için uygulanmaktadır. DNA dizi analizi yöntemiyle mikobakteriler tanımlanabilir ve direnç genleri saptanabilir. Tanı tekniklerindeki geli melere ve immün yetmezlik yapan hastalıkların artı na ba lı olarak her geçen gün daha fazla sayı ve türde tüberküloz dı ı mikobakteri hastalık etkeni olarak tanımlanmaktadır. Tür tanımlamasında kullanılan biyokimyasal yöntemlerin zahmetli olması, uzun zaman alması ve klinik mikobakteri örneklerinin %14'ünün fenotipik yöntemlerle

tanımlanamaması DNA dizi analizi yönteminin daha yaygın kullanılmasına neden olmuştur (57,58).

Otomatize DNA dizi analizi yönteminde polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edilen hedef DNA ve bu DNA kalıbına tutunan 20 baz çiftlik bir primer kullanılmaktadır. DNA polimeraz enzimi karışıma eklenince deoksine nükleotid trifosfat varlığında primerin tutunduğu kalıp 3' ucundan sentez reaksiyonunu başlatır. Reaksiyon tüpünde bulunan her biri farklı floresan boya ile etiketlenmiş dideoksine nükleotid trifosfatlar (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) DNA polimeraz etkisiyle uzayan DNA zincirine katılarak zinciri sonlandırır. Çünkü yapısal olarak deoksine nükleotid trifosfatlara benzeyen dideoksine nükleotid trifosfatlar 3' uçlarında hidroksil grubu bulunmadığından kendilerinden sonra 5'-3' fosfat bağlanmasını engeller. Sekans-spesifik olarak sonlanan DNA dizileri kapiller jel elektroforezi ile yürütülür. Bu işlem esnasında sistemde bulunan saptayıcı tarafından sonlanan her bir dizide bulunan dideoksine nükleotid trifosfatların yaydığı farklı dalga boyundaki floresanslar kaydedilerek bilgisayar ortamında DNA dizilerine çevrilir (58).

DNA dizi analizi önceden bilinen mutasyonların yanında bilinmeyen mutasyonları da saptayabilen, özgüllük ve duyarlılığı tam olan, standart referans yöntemidir. *rpoB* geni gibi yoğun ve mutasyonların kısa segmentle sınırlı olduğu direnç genlerinin saptanması rutin uygulamada başarıyla kullanılırken, INH direncinde olduğu gibi mutasyonların da küçük ve büyük segmentler halinde olduğu durumlarda kolay uygulanabilir bir yöntem değildir. DNA dizi analizinin önemli bir dezavantajı da sessiz mutasyonları da saptamasıdır (53,57,58).

2.7. KORUNMA ve KONTROL

Tüberkülozdan korunma; bula tırıcı hastaların tedavisi, koruyucu ilaç tedavisi, BCG a ısı, tüberküloz bula nın önlenmesiyle mümkün olabilir. Koruyucu ilaç tedavisindeki amaç, tüberküloz hastası ile teması olan ki ide enfeksiyon geli mesini ya da tüberküloz basiliyle enfekte ki ide tüberküloz hastalı mın geli imini önlemektir. BCG, tüberküloz enfeksiyonundan koruyucu etki yapmaz, kanla ve lenfatik sistemle basilin yayılmasını engelleyerek hayatı tehdit eden milier tüberküloz, menenjit tüberküloz gibi klinik tabloların ortaya çıkı mını azaltır. En çok bula ma, tanı öncesinde oldu u için bula tırıcı olgulara hızla tanı konulması ve tedavi ba lanması, bula nın engellenmesi için önemlidir. Enfeksiyon zincirini kırmak, kaynak ve bula yollarını saptamak için en de erli yöntemler moleküler epidemiyolojik yöntemlerdir (4,5).

2.7.1. Moleküler Yöntemlerin Katkısı

Moleküler epidemiyoloji bir hastalı nın yayılımı, patogenezini ve etyolojisini ara tıran bilim dalıdır. Moleküler epidemiyolojik çalı malar salgınların ara tırılması, reaktivasyon veya reenfeksiyon olgularının belirlenmesi, patojenlerin dünyadaki yayılımlarının belirlenmesi, farklı su larda virulans ve direnç mekanizmalarının anla ılması, enfeksiyon hastalıklarının yayılım yollarının ortaya konması, hastalı nın yayılımı ile olu an risk faktörlerinin belirlenmesi, tedavi ve korunma stratejilerinin geli tirilmesinde kullanılmaktadır (5).

Tüberkülozla mücadele ve tüberküloz insidansının dü ürülmesi için erken tanı, do ru tedavi ve etkin korunma-kontrol programları çok önemlidir. Enfeksiyon kayna ı ve bula yollarının bilinmesinin, etkin kontrol önlemleri alınması ve tüberkülozla mücadele stratejilerinin belirlenmesinde büyük katkısı vardır. Tüberkülozlu hastalardan izole edilen su ların moleküler tiplendirme yöntemleriyle tiplendirilmesiyle; tüberkülozda kaynak ve bula yolları tespit edilmekte, salgınlar saptanabilmekte, laboratuvaradaki çapraz kontaminasyonlar gösterilebilmekte, hastalı nın yayılım dinami i ve özellikleri ortaya konabilmekte, reenfeksiyon ve reaktivasyon ayrımı yapılabilmekte, hastalı nın toplum içinde yayılımı daha net anla ılmakta ve tüberküloz epidemiyolojisi hakkındaki bilgilerimiz artmaktadır (5-8).

Tüberkülozlu hastalardan izole edilen su ların moleküler tiplenede aynı grup içinde yer alması, bu hastaların tüberkülozla çapraz bula sonucunda enfekte olduklarını gösterir. Çapraz bula oranlarıyla ilgili bilgiler tüberkülozla mücadelede daha etkili olabilecek korunma ve kontrol stratejilerinin geli tirilmesine büyük katkılar sa lamaktadır. Aynı etkene ba lı dı kaynaklı bula , endojen kaynaklı reaktive olan latent enfeksiyondan moleküler tiplendirme yöntemleriyle ayırt edilebilmektedir. Toplumda çapraz bula sonucu meydana gelmi tüberküloz olgularının sayısı fazlaysa bu durum korunma ve kontrol tedbirlerinin yetersizli ini gösterir (59-61). Moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemleriyle spesifik *M. tuberculosis* klonları, bu izolatlarının klonal olarak ili kili olup olmadıkları veya Ç D *M. tuberculosis* su larının filogenetik düzeyde yaygınlı ı hakkında bilgi edinilebilmektedir (8,59-62).

2.7.2. Moleküler Epidemiyolojik Yöntemlerin Mekanizması

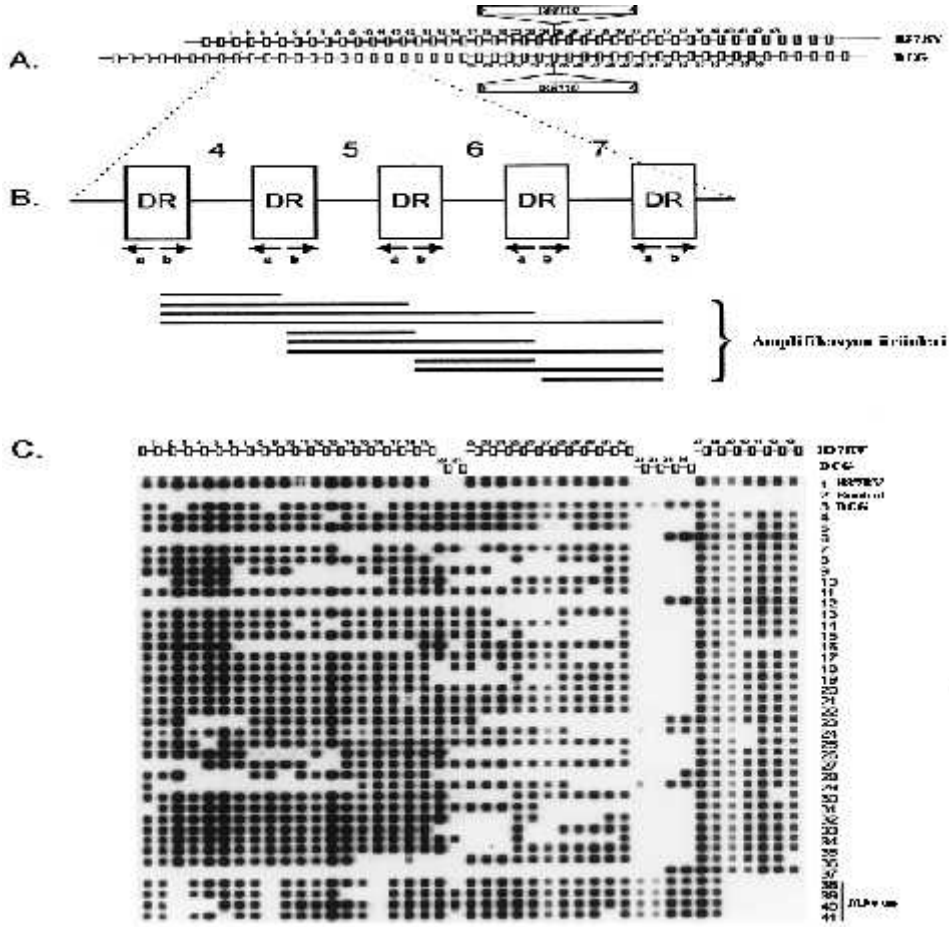
2.7.2.1. IS 6110 RFLP (Resrtiction Fragment Lenght Polimorfizm) :

IS6110 RFLP günümüzde kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinden en yüksek ayırım gücüne sahip olan yöntemdir. IS6110 MTK genomu üzerinde farklı kopya sayılarında (1-20 kadar) ve farklı kromozomal entegrasyon bölgelerinde bulunan transpozondur. Sayı ve lokalizasyon bakımından IS6110 transpozonunun su lar arasında farklılık göstermesi yöntemin temelini olu turur (6,63). RFLP yöntemi: kromozomal DNA PvuII makrorestriksiyon enzimiyle IS6110 baz dizilimlerinin bulundu u yerden kesilerek fragmentlere ayrılması, agaroz jel elektroforeziyle fragmentlerin ayrı tırılması, jeldeki DNA parçaları southern blot tekni iyle naylon membrana aktarılması, membrana ba lı olan fragmentlerin IS6110'a özgü i aretli problarla hibridizasyonu ve hibridizasyonun kemiluminasan kit kullanılarak görüntülenmesi a amalarından olu maktadır. Probların ba landı ı yerlerde ı ima olu makt ve olu an ı ima X-ray filmine aktarılmaktadır. Her su a özgü IS6110 profili, film banyo edilince siyah bantlar halinde gözlemlenmektedir (63,64). IS6110-RFLP be ve daha fazla sayıda IS6110 kopya sayısı içeren *M. tuberculosis* izolatlarında referans yöntemdir. Yüksek düzeyde ayırım gücünden dolayı di er tiplendirme yöntemlerinin do rulanmasında kullanılmaktadır. IS6110

kopya sayısının be ten az oldu u su larda yöntemin ayırım gücünün zayıf olması, yo un emek gerektirmesi, uzun zaman alması, bol miktarda genomik DNA gerektirmesi bu yöntemin en büyük dezavantajlarıdır (6,8,64).

2.7.2.2. Spoligotiplendirme:

Goguet de la Salmoniere ve arkadaşları tarafından *IS6110* RFLP yöntemindeki problemlerin üstesinden gelmek için PZR bazlı tiplendirme yöntemi olan spoligotiplendirme 1997 yılında uygulamaya konuldu. PZR bazlı ters dot blot hibridizasyon temeline dayanan tüberküloz için en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemidir. MTK genomunda *IS6110* integrasyonunun sıcak noktasında 36 baz çiftlik direkt tekrar (DR) lokusları ve DR'lerin arasında 94 farklı spacer (ayırıcı) tanımlanmıştır. Ayırıcılardan 43 tanesi spoligotiplendirme yönteminde rutin laboratuvarında kullanılmaktadır. DR'lerin kopya sayısı ve spacer dizilimlerinin varlığı veya yolumu *M. tuberculosis* su larının genomları arasında farklılık göstermektedir. Spoligotiplendirme yöntemi DR lokusundaki bu farklılıkları ortaya koyar (65,66).



ekil 2: Spoligotiplendirme yönteminin a amaları. (A): DR'lerin *M. tuberculosis* ve *M. bovis* BCG genomdaki da ılımı. (B): PZR ile DR lokusunun amplifikasyonu. (C): Amplifiye olmu mikobakterial DNA örneklerinin hibridizasyon paternleri (65).

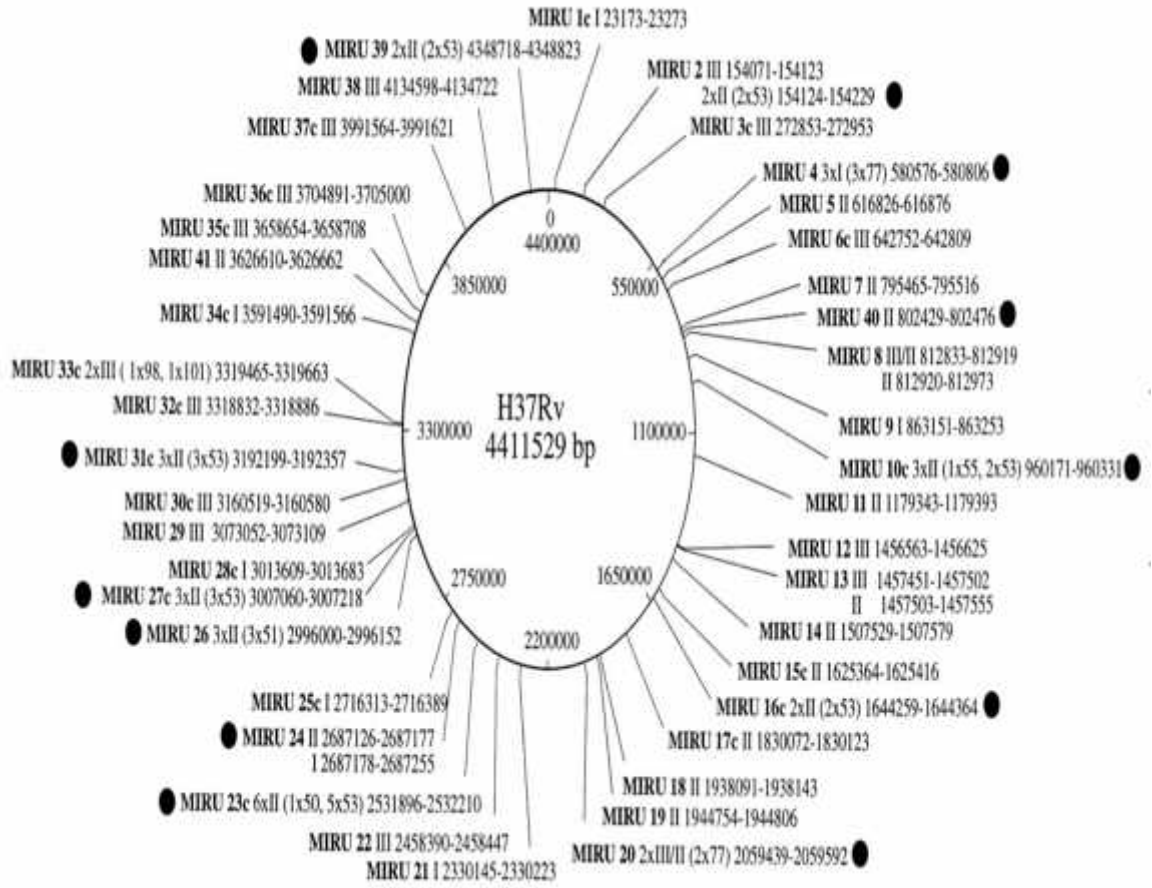
M. tuberculosis genomu üzerinde bulunan DR lokusundaki DNA polimorfizmini göstermeyi amaçlayan yöntemde DR dizilimini hedef alan biyotini ile aretlenmi primerler kullanılarak DR'lerin arasındaki farklı ayırıcılar amplifiye edilmektedir. Membrana ba lanmı olan ve DR'lerin arasındaki spacer bölgelere komplementer olan 43 farklı oligonükleotid probla, amplifikasyon ürünü hibridizasyona sokulmaktadır. Dijital olarak kırk üç spacer diziliminin her birinin varlı ı ve yoklu u kullanılarak rakamsal veriler elde edilmektedir (65,67).

Spoligotiplendirme yöntemi, moleküler epidemiyoloji, popülasyon genetiği, filogenetik analiz, IS6110 kopya sayısı düşük olan izolatların oluşturduğu kümelemeyi doğrulamak için kullanılmaktadır. Spoligotiplendirme yöntemi için minimal bir üreme yeterli olmakla beraber IS6110 RFLP'den çok daha kısa sürede sonuç alınabilmektedir. Ayrım gücü ise IS6110 RFLP'den düşük olduğu için genetik heterojiniteyi saptamada yetersiz kalıp hatalı kümelemelere sebep olmaktadır. Spoligotiplendirme yöntemiyle elde edilen oktal kodlar kullanılarak <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo> internet adresinden su laraya ait "spoligotype international type" (SIT) numaraları elde edilmektedir. SIT numaraları, SpolDB4 verileriyle karşılaştırılarak major spoligofamilyaları belirlenir. Toplumdan izole edilen su larla, diğer ülkelerde da ılım gösteren major familyalar ve SIT tipleri arasındaki filogenetik ilişkileri bu bilgilerle incelenebilmektedir (6,8,66,67).

2.7.2.3. MIRU –VNTR:

M. tuberculosis genomunda genler ve operonlar arasında da ılımı 10- 100 baz çifti uzunlukta minisatellit benzeri lokuslar bulunmaktadır. Bu tekrar dizilerine MIRU adı verilmektedir. MTK genomu boyunca 41 MIRU lokusunun her biri farklı sayıda sıralı tekrarlar VNTR içermektedir. Birbirleriyle ilişkili olmayan *M. tuberculosis* izolatları arasında kırk bir lokustan bazıları VNTR kopya sayısı bakımından polimorfizm göstermektedir. PZR bazlı bu metotta, bu polimorfizm analizi *M. tuberculosis* kökenlerinin genotiplendirilmesinde kullanılmaktadır. MIRU VNTR tiplendirme yönteminde ilk olarak 12 farklı lokusta bulunan MIRU'lar kullanılmı daha sonra 15 ve 24 lokusun ayırt edicilik güçleri üzerine ara tırmalar yapılmı tır. 15 lokus içeren MIRU- VNTR protokolünün ayırt etme gücünün IS6110 RFLP ile eşit, spoligotiplendirmeden üstün olduğu belirlenmiştir. Filogenetik ara tırmalarda ise 24 lokus kullanılması önerilmektedir (65,68).

MIRU-VNTR tiplendirme yönteminde ilk olarak multipleks PZR ile, floresanla işaretli oligonükleotid primerler kullanılarak MIRU-VNTR lokuslarının amplifikasyonu yapılır. Daha sonra amplifikasyon ürünleri elektroforezle ayrı tırılarak her bir lokustaki PZR ürünlerinin büyüklüğüne göre MIRU alellerinin sayısı belirlenir (65,68).



ekil 3: *M. tuberculosis* genomunda 41 MIRU lokusu (65).

MIRU VNTR tiplendirme yönteminin yüksek ayırım gücü, kısa sürede tamamlanabilmesi, laboratuvarlar arasında karışılabilir dijital sonuç vermesi, otomatize edilebilmesi, MTK izolatları için duyarlı ve özgül olması, tüberkülozun küresel epidemiyolojik surveyansı için cazip bir teknik haline gelmesine neden olmaktadır. Metodun kurulması otomatik dizi analizi cihazı olan laboratuvarlar için oldukça kolaydır. MIRU-VNTR tiplendirme yöntemi IS6110 RFLP ve spoligotiplendirme yöntemlerine göre daha fazla ayırt edici profil oluşturmaktadır. Son çalışmalarında MIRU-VNTR tiplendirme yönteminin geniş kentsel alanlardaki *M. tuberculosis* izolatlarının genetik farklılıklarını belirlemek için faydalı bir ilk adım yöntemi olabileceği ve *M. tuberculosis*'in moleküler epidemiyolojisinin küresel analizinde referans yöntem olarak kullanılabilirliği belirtilmektedir (65).

GEREÇ ve YÖNTEM

2.4. MYCOBAKTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARI:

Türkiye'nin farklı merkezlerinden 2008-2010 yılları arasında toplanmış ve Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Tüberküloz Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı stoklarında bulunan 58 adet RIF ve INH dirençli *M. tuberculosis* suşu çalı maya alındı.

3.2. R FAMP S N ve ZON AZ D D RENC N N FENOT P K YÖNTEMLERLE DO RULANMASI

Direnç belirlenmesinde LJ besiyerinde uygulanan, poporsiyon yöntemi uygulandı. A a ıda a amaları verilmiş olan i lemlerin uygulanmasında Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Tüberküloz Referans Labaratuarı tarafından hazırlanmış olan protokol takip edildi (69).

3.2.1. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

1. Her izolat için 3 adet 50 ml'lik, konik tabanlı, burgu kapaklı, polipropilen yapıda tüp kullanıldı. Birinci tüpe ana bakteri dilüsyonu, ikinci tüpe 10^{-2} , üçüncü tüpe 10^{-4} i aretlemleri yapıldı.

2. Ana dilüsyon hazırlanacak birinci tüpe 10-12 adet steril cam boncuk ve 6 ml steril distile su eklendi. Di er iki tüpe 9.9 ml steril distile su eklendi.

3. Yirmisekiz günlük taze kültürden 2 öze dolusu koloni alınıp ana dilüsyon tüpüne eklendi. Tüpe 2-3 dakika vorteks yapıldı. 30 dakika oda ısısında tüp bekletilip partiküllerin dibe çökmesi sa landı.

4. Süpernatant alınıp ba ka bir tüpe aktarıldı. Üzerine steril distile su eklenerek McFarland No:1 standardına e itlendi (10^7 cfu/ml bakteri yo unlu u). Vorteks yapıldı. 100 µl alınıp 10^{-2} dilüsyon tüpüne aktarıldı.

5. 10^{-2} dilüsyon tüpüne 20-25 saniye vorteks yapıldı. 100 µl alınıp 10^{-4} dilüsyon tüpüne aktarıldı.

3.2.2. Besiyerlerine Ekim ve Sonuçların De erlendirilmesi

1. 10^{-2} dilüsyon tüpünden, 10^{-2} ilaçlı LJ besiyeri setlerine, 10^{-2} kontrol tüplerine ve 0.5 mg/ml para-nitrobenzoik asit (PNB) bulunduran besiyerine 200 µl ekim yapıldı.

ilaçlı besiyerleri:

a. RIF 40 µg/ml

b. INH 0.2 µg/ml

c. INH 1 µg/ml

2. 10^{-4} dilüsyon tüpüne 20-25 saniye vorteks yapıldı. 10^{-4} LJ besiyerlerine 200 µl ekim yapıldı ve bu tüpler kontrol tüpü olarak de erlendirildi.

3. lemler bitince tüpler hafif ekilde a a ı yukarı hareket ettirilerek, sıvıların besiyerleri üzerine yayılması sa landı. Bütün besiyeri tüpleri 37°C'da etüvde, 6 hafta boyunca, yatık ekilde inkübe edildi.

4. nkübasyon sonunda PNB besiyerinde üreme olmamı izolatlar MTK olarak de erlendirildi.

5. 10^{-2} ilaçlı LJ besiyeri setlerindeki koloni sayıları, 10^{-4} kontrol LJ besiyerlerindeki koloni sayılarından fazla ise izolatlar dirençli olarak de erlendirildi.

6. INH için kritik konsantrasyonda (0.2 µg/ml) direnç tespit edildi inde, 1.0 µg/ml lik konsantrasyona bakıldı. Bu durumda su duyarlı ise kritk konsantrasyonda dirençli, yüksek konsantrasyonda duyarlı olarak de erlendirildi.

3.3. R FAMP S N ve ZON AZ D D RENC NDEN SORUMLU MUTASYONLARIN BEL RLENMES

DNA ekstraksiyonu N-acetyl-N, N, N-trimethyl amonyum bromür (CTAB) yöntemi kullanılarak yapılmı tır (65).

3.3.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu:

M. tuberculosis su larının spoligotiplendirme, MIRU-VNTR yöntemiyle klonal ili kinin belirlenmesi ve dirençten sorumlu mutasyonların DNA dizi analizi yöntemiyle saptanması için LJ katı besiyerinden CTAB yöntemiyle DNA

ekstraksiyonu yapıldı. DNA ekstraksiyonundan sonra spektrofotometre ile DNA ölçümü yapılarak DNA miktarı kontrol edildi. Her bir *M. tuberculosis* suşundan elde edilen DNA ekstraktı ile spoligotiplendirme, MIRU-VNTR ve DNA dizisi analizi yöntemleri çalışıldı.

3.2.2. LJ Besiyerinden DNA izolasyonu (65):

1. Steril eküvyon çubuk kullanılarak, besiyeri almadan, mümkün oldukça fazla koloni alındı.

2. Toplanan bakteriler 500 µl 10 mM Tris-1mM EDTA (TE) tamponu içeren mikrosantrifüj tüpüne alınıp, 80°C'da 20 dakika ısı bloğunda bekletilerek bakterilerin ölmesi sağlandı.

3. TE tamponu içinde hazırlanan bakteri süspansiyonu üzerine 50 µl lizozim eklenip vortekslendi. 37°C'da 2 saat inkübe edildi. inkübasyon sırasında her yarım saatte bir vorteks yapıldı.

4. 70 µl %10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve 12 µl Proteinaz K eklenip, vortekslendi. 65°C'da 30 dakika inkübe edildi. inkübasyon sırasında her on dakikada bir vorteks yapıldı.

5. 100 µl 5 Molar Sodyum Klorür (NaCl) eklenip, vorteks yapıldı.

6. 80 µl %10'luk N-acetyl, N, N-trimethyl amonyum bromür (CTAB) önceden 65°C'da ısıtılıp eklendi. Rengi sütlü bir görünüm alana kadar vorteks yapıldı. 65°C'da 10 dakika inkübe edildi.

7. 24/1 oranında hazırlanmış 800 µl taze kloroform/izoamil alkol eklendi. 10 saniye vorteks yapıldı. Oda ısısında, 12.000xg'de santrifüj edildi

8. Mikropipet ile üst faz yeni bir tüpe transfer edildi ve kloroform/izoamil alkol basamağı tekrarlandı. Santrifüjden sonra üst fazla işlem devam edildi.

9. 500 µl isopropanol eklenip, -70°C'da 1 saat bekletildi.

10. Oda ısısında, 15 dakika, 12.000xg'de santrifüj edilip, süpernatant atıldı.

11. Kalan CTAB ve isopropanolu uzakla tırmak için DNA pelleti üzerine 1ml so uk %70'lik ethanol eklenerek vortekslendi.
12. Oda ısısında, 10 dakika, 12.000xg'de santrifüj edilip, süpernatant atıldı.
13. DNA pelleti oda ısısında 15 dakika kurutuldu.
14. 20 mikrolitre steril TE tamponu ilave edildi ve 37°C'da iki saat bekletildi.
15. Uv spektrofotometrede 260nm dalga boyunda DNA konsantrasyonu ölçüldü.
16. -20°C'da saklandı.

3.3.3. Rifampisin Direncinin Belirlenmesi

Bu çalı mada Ç D *M. tuberculosis* su larında DNA dizi analizi yöntemiyle RIF direncinden sorumlu *rpoB* gen bölgesindeki mutasyonlar ara tırılmı tır. DNA dizi analizi yönteminin uygulanmasında Türkiye Halk Sa lı ı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Ba kanlı ı Moleküler Mikrobiyoloji Ara tırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda kullanılan protokol takip edilmi tır.

3.3.3.1. *rpoB* Geninin Amplifikasyonu

zolasyonu yapılan DNA kalıp olarak kullanıldı. *rpoB* geni *rpoB*-Forward, *rpoB*-Reverse primerleri kullanılarak PZR ile ço altıldı. Her bir su için a a ıdaki miktarda reaksiyon karı ımı hazırlandı (70).

***rpoB*-F:** 5'-CCA CCC AGG ACG TGG AGG CGA TCA CAC-3'

***rpoB*-R:** 5'-CGT TTC GAT GAA CCC GAA CGG GTT GAC-3'

10X tampon (Fermentas, EU)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas, EU)	5 µl
dNTP miks (10 mM) (Fermentas, EU)	1 µl
<i>rpoB</i> Primer F(10pmol/µl)	1 µl
<i>rpoB</i> Primer R(10pmol/µl)	1 µl

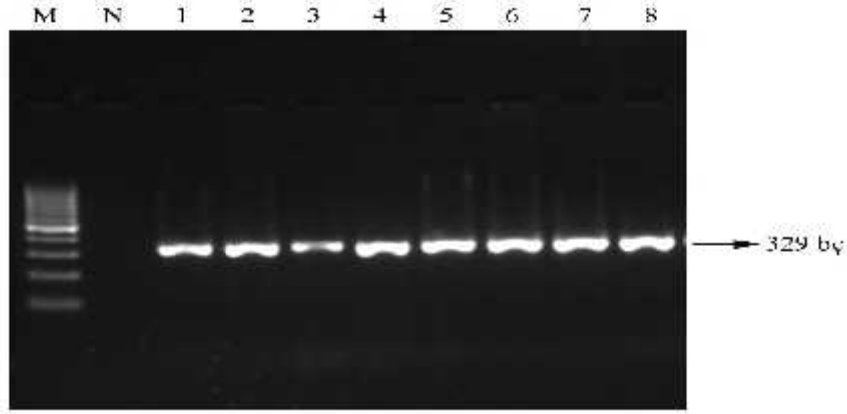
Tag DNA polimeraz (5U/ μ l) (Fermentas, EU)	0.5 μ l
dH ₂ O (DNAaz-Rnaz free)	35.5 μ l
1/10 Sulandırılmı DNA	1 μ l
Toplam	50 μ l

Yukarıdaki karışımlardan DNA hariç hepsi temiz odaya hazırlandı. Sonra DNA'nın olduğu odaya geçildi ve reaksiyon tüplerine tek tek DNA eklendi. Reaksiyon tüpleri vorteks yapıp homojenize edildikten sonra ısı döngü cihazına yerleştirilerek aşağıdaki döngüde çalıştırıldı.

94°C	10 dakika	
94°C	1 dakika	} 30 döngü
60°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	10 dakika	
4°C	Beklet	

3.3.3.2. Agoroz Jel Elektrofrez

Amplifikasyon sonrası bantların kontrolü jel elektroforziyle yapıldı. %2'lik agaroz jel hazırlandı. Amplifiye ürünün 4 μ l'sine 1 μ l jel yükleme boyası karıştırılıp agaroz jele yüklendi. 120 voltta 30 dakika elektroforez işlemi yapıldı. Moleküler ağırlık standardı yardımıyla bantların büyüklüğü, saflığı ve yoğunluğu kontrol edildi. Amplifikasyon ürünü tek bant halinde olan uygun örneklerle pürifikasyon işlemine geçildi.



ekil 4: *rpoB* PZR amplifikasyon görüntüsü.

M: 100 baz çiftlik mareker, N: Negatif kontrol, 1-8 : Pozitif örnekler.

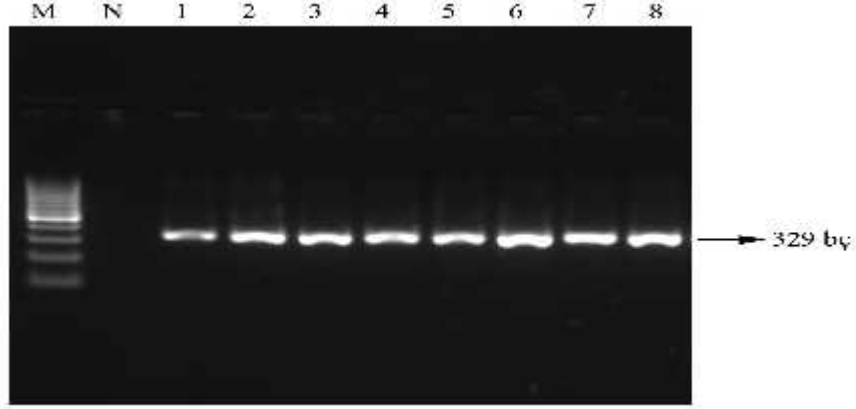
3.3.3.3.Amplifikasyon Ürünlerinin Pürifikasyonu

Safla tırma i lemi Beckman Coulter Agencourt AMPure XP kit protokolüne uygun olarak a a ıdaki ekilde yapıldı.

- 1.PZR ürünü 82.6 μ l Agencourt AMPure Solüsyonu ile karı tırıldı.
- 2.Pipetle 10 kez pipetaj yapıldıktan sonra vorteks yapıp karı ımın homojenize olması sa landı.
- 3.Be dakika oda sıcaklı ında bekletildi.
- 4.Örne in tamamı SPRI Plate, 96 Ring Süper Manyetik Plate'teki 0.2 ml'lik tüplere aktarıldı. 10 dakika bekletilip, solüsyonun tamamı aspire edildi.
- 5.%70'lik 4°C sıcaklı ındaki etanolden 200 μ l tüpe ilave edildi. 30 saniye oda ısısındaki inkübasyondan sonra solüsyon aspire edildi.
6. Yıkama i lemi bir kez daha tekrarlandı. 20 dakika hava ile kurutuldu.
- 7.20 μ l dH₂O (DNAaz-Rnaz free) eklenip, 10-15 kez pipetaj yapılarak tüpün cidarındaki ürün çözüldü.
- 8.Be dakika bekletildikten sonra berrak solüsyon tüpün ortasından pipetle çekildi.

3.3.3.4. Agaroz Jel Elektrofözezi

%2'lik agaroz jel kullanılarak pürifikasyon sonrası elektroforezle bantların kontrolü yapıldı. ekilde örne i görülen bantların büyüklü üne göre dideoksi terminatör tepkimesinde kaç mikrolitre ürün kullanılacağı belirlendi.



ekil 5: *rpoB* PZR pürifikasyon görüntüsü.

M: 100 baz çiftlik marker, N: Negatif kontrol, 1-8 : Pozitif örnekler.

1 numaralı örnekten 4 µl, di er örneklerden 3 µl kullanıldı.

3.3.3.5. Dideoksi Terminatör Tepkimesi (Cycle Sequence)

Her bir reaksiyon karışımının toplam hacmi 10 µl olacak ekilde hazırlandı.

DTCS Quick Start Mix (Fermentas, EU)	4 µl
<i>rpoB</i> Primer 1(5pmol/µl)	1 µl
dH ₂ O (DNAaz-Rnaz free)	1-2 µl
DNA	3-4 µl

Amplifikasyon Koşulları

94°C	3 dakika	} 30 döngü
96°C	20 saniye	
55°C	30 saniye	
60°C	4 dakika	

3.3.3.6. Sekans Ürünlerinin Temizlenmesi:

Sekans ürünleri alkol presipitasyon yöntemiyle safla tırıldı. Her bir örnek için 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü kullanıldı.

1.Total hacmi 5 µl olan taze Stop Solüsyonu/Glikojen karı ımı hazırlandı. Her bir tüpe 2 µl 3 M Sodyum asetat (pH:5.2), 2 µl 100 mM Sodyum-EDTA (pH:8), 1 µl 20mg/ml glikojen eklenip vorteks yapıldı.

2.Karı ımın üzerine 10 µl DNA eklenip, vorteks yapıldı. Üzerine -20°C'da so utulmu , 60 µl %95 etanol eklenerek vorteks yapıldı.

3.14.000xg'de +4°C' da 15 dakika santrifüj edilip, süpernatant atıldı.

4. Pelet -20°C'da so utulmu 200 µl %70 etanol ile yıkandı.

5. 4.000xg'de +4°C'da 10 dakika santrifüj edilip, süpernatant atıldı.

6. Yıkama i lemi bir kez daha yapıldı.

7.Tüpler ka ıt havlu üzerinde, hava ile 15 dakika kurutuldu.

8.Pelet 40 µl örnek yükleme solüsyonuyla Sample Loading Solution (SLS) ile çözüldü.

9. 35 µl örnek yükleme plate'e aktarılıp, üzerine 1 damla mineral ya eklendi.

3.3.3.7. DNA Kapiller Jel Elektroforezi

DNA kapiller jel elektroforezi Beckman Coulter Ceq 8000 cihazı ile gerçekleştirildi. Program:Kapiller sıcaklı ı: 50⁰ C, Denatürasyon sıcaklı ı: 90⁰ C, Denatürasyon süresi: 120 saniye, njeksiyon akımı: 2.0 kV, njeksiyon süresi: 15 saniye, Ayrı tırma akımı: 4.0 kV, Ayrı tırma süresi: 110 dakika. DNA dizi analizi sonucu elde edilen veriler, referans *rpoB* gen dizilimiyle karşılaştırılarak mutasyonlar saptandı.

3.3.4. zoniazid Direncinin Belirlenmesi

3.3.4.1. *katG* ve *inhA* Promoter Geninin Amplifikasyonu

zolasyonu yapılan DNA kalıp olarak kullanıldı. *katG* gen bölgesi *katG*-F, *katG*-R, *inhA* promoter gen bölgesi *inhA*-F, *inhA*-R primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Her bir su için ve *katG*, *inhA* promoter gen bölgeleri için ayrı ayrı a a ıdaki miktarda reaksiyon karı ımı hazırlandı (71,72).

***katG*-F:** 5'-AAC GAC GTC GAA ACA GCG GC-3'

***katG*-R:** 5'-GCG AAC TCG TCG GCC AAT TC-3'

***inhA*-F:** 5'-GGC ACG TAC ACG TCT TTA TGT A-3'

***inhA*-R:** 5'-GGT GCT CTT CTA CCG CCG TGA A-3'

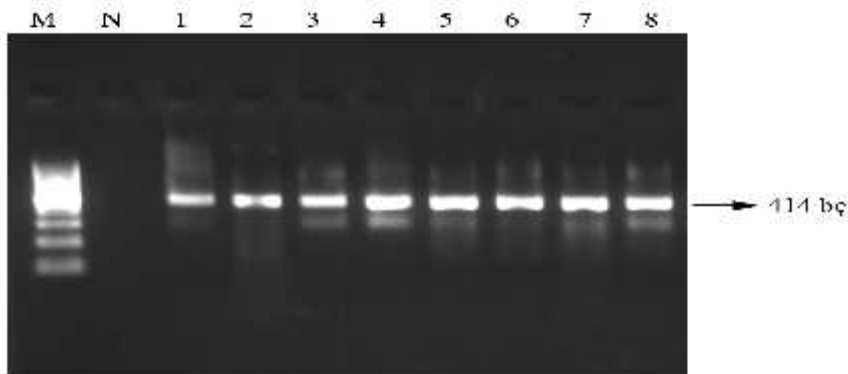
10X tampon (Fermentas, EU)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas, EU)	1µl
dNTP (10 mM) (Fermentas, EU)	1 µl
<i>katG</i> Primer 1 veya <i>inhA</i> Primer 1(10pmol/µl)	1 µl
<i>katG</i> Primer 1 veya <i>inhA</i> Primer 1(10pmol/µl)	1 µl
Tag DNA polimeraz (5U/µl) (Fermentas, EU)	0.5 µl
dH ₂ O (DNAaz-Rnaz free)	35.5 µl
1/10 Sulandırılmı DNA	1 µl
Toplam	50 µl

Yukarıdaki karı ımlardan DNA hariç, hepsi temiz odada hazırlandı. Sonra DNA'nın oldu u odaya geçildi ve reaksiyon tüplerine tek tek DNA eklendi. Reaksiyon tüpleri vorteks yapıp homojenize edildikten sonra ısı döngü cihazına yerle tirilerek a a ıdaki döngüde çalı tırıldı.

94°C	10 dakika		
94°C	1 dakika	}	30 döngü
65°C	1 dakika		
72°C	1 dakika		
72°C	10 dakika , 4°C		Beklet

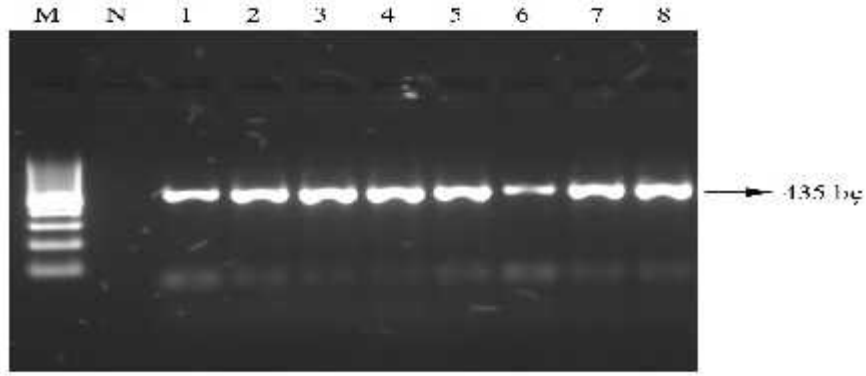
3.3.4.2. Agoroz Jel Elektrofizi

Amplifikasyon sonrası bantların kontrolü jel elektroforziyle yapıldı. %2'lik agaroz jel hazırlandı. Amplifiye ürünün 4 µl'sine 1 µl jel yükleme boyası karı tırılıp agaroz jele yüklendi. 120 voltta 30 dakika elektroforez i lemi yapıldı. Moleküler a ırlık standardı yardımıyla bantların büyüklü ü, saflı ı, yo unlu u kontrol edildi. Amplifikasyon ürünü tek bant halinde olan uygun örneklerle pürifikasyon i lemine geçildi.



ekil 6: *katG* PZR amplifikasyon görüntüsü.

M: 100 baz çiftlik mareker, N: Negatif kontrol, 1-8 : Pozitif örnekler.



ekil 7: *inhA* PZR amplifikasyon görüntüsü.

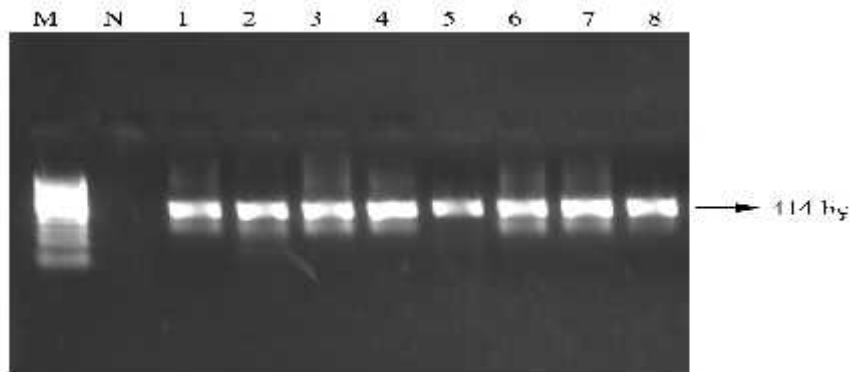
M: 100 baz çiftlik mareker, N: Negatif kontrol, 1-8 : Pozitif örnekler.

3.3.4.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Pürifikasyonu

rpoB gen bölgesine uygulanan ekilde yapıldı.

3.3.4.4. Agaroz Jel Elektrofözezi

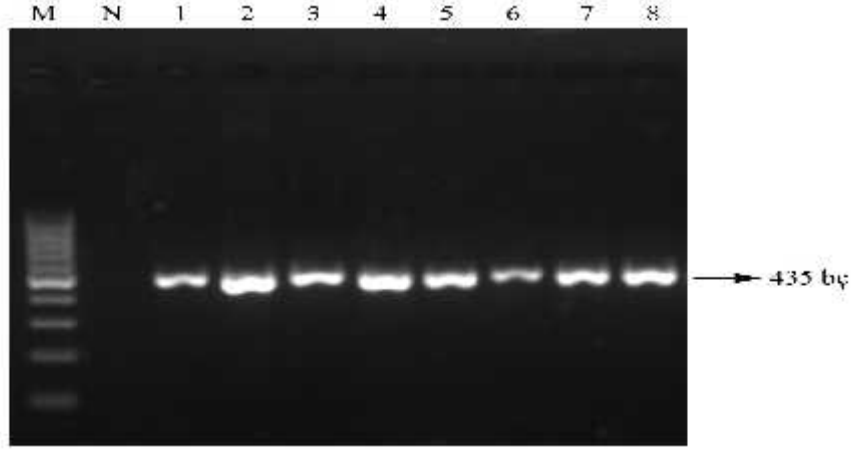
%2'lik agaroz jel kullanılarak pürifikasyon sonrası elektrofözele bantların kontrolü yapıldı. ekildeki bantların saflı ı ve kalınlı ına göre cycle sequence i leminde kaç mikrolitre ürün kullanılaca ı belirlendi.



ekil 8: *katG* PZR pürifikasyon görüntüsü.

M: 100 baz çiftlik mareker, N: Negatif kontrol, 1-8 : Pozitif örnekler.

5 numaralı örnekten 4 µl, di er örneklerden 3 µl kullanıldı.



ekil 9: *inhA* PZR amplifikasyon görüntüsü.

M: 100 baz çiftlik mareker, N: Negatif kontrol, 1-8 : Pozitif örnekler.

1, 3, 6 numaralı örnekten 4 µl, di er örneklerden 3 µl kullanıldı.

3.3.3.5. Dideoksi Terminatör Tepkimesi (Cycle Sequence)

rpoB gen bölgesine uygulanan ekilde yapıldı.

3.3.3.6. Sekans Ürünlerinin Temizlenmesi:

rpoB gen bölgesine uygulanan ekilde yapıldı.

3.3.3.7. DNA Kapiller Jel Elektroforezi

DNA kapiller jel elektroforezi Beckman Coulter Ceq 8000 cihazı ile gerçekleştirildi. DNA dizi analizi sonucu elde edilen veriler, referans *katG* ve *inhA* gen dizilimleriyle karşılaştırılarak mutasyonlar saptandı.

3.4. MOLEKÜLER TİPLENDİRME

3.4.1. Spoligotiplendirme (65):

Spoligotiplendirme yönteminin uygulanmasında Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda kullanılan protokol takip edilmiştir. CTAB yöntemi kullanılarak elde edilen DNA ile spoligotiplendirme metodu uygulandı. DR bölgesini hedef alan primerler sentezletildi. Spoligotiplendirme metodunun PZR aşamasında DR bölgelerine özgü primerler kullanılarak "spacer" ların amplifikasyonu gerçekleştirildi. Her çalışmada *M. tuberculosis* H37Rv pozitif kontrol ve distile su negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.4.2. PZR

DRa ve DRb primerleri kullanılarak her bir su için a a ıdaki miktarda reaksiyon karı ımı hazırlandı.

DRa: 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3' (5' ucundan biyotinle i aretli)

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

2X amplifikasyon karı ımı:

10X amplifikasyon tamponu	100 µl
10X dNTP miski(10 mM her bir nükleotid)	100 µl
10X MgCl ₂ (25 mM)	100 µl
Distile Su	100 µl

Amplifikasyon Reaksiyonu

2X amplifikasyon miksi	12.5 µl
Primer DRa (5 pmol/µl)	4 µl
Primer DRb (5 pmol/µl)	4 µl
Tag DNA polimeraz (5U/ µl)	0.3 µl
dH ₂ O (DNAaz-Rnaz free)	1.7 µl
Kalıp DNA	2.5 µl
Toplam	25 µl

PZR reaksiyon karı ımını içeren tüpler ısı döngü cihazına yerle tirilerek a a ıdaki döngüde çalı tırıldı.

95°C	5 dakika	
94°C	1 dakika	} 25 döngü
55°C	1 dakika	
72°C	45 saniye	
72°C	10 dakika	
4°C	Beklet	

Kontaminasyondan kaçınmak için PZR reaksiyon karışımı *M. tuberculosis* DNA'sı içermeyen temiz odada hazırlandı. Amplifikasyon tüplerinin kapağı temiz odadan uzak bir yerde açıldı. Çalışma sırasında pudrasız eldiven ve filtreli pipet uçları kullanıldı.

3.4.3. PZR Ürününün Hibridizasyonu ve Sonuç Gözleme

Biyotinleştirilmiş amplifiye PZR ürünü, membrana bir hat ekinde kovalent olarak bağlanmış farklı "spacer" problemleri ile hibridize edildi.

3.4.3.1. Hibridizasyon Yöntemi (65):

1. Amplifikasyon tüplerine 150 µl 2x Sodyum klorür, Sodyum fosfat, EDTA (SSPE)/%0.1 SDS eklendi. 100 °C'daki kuru ısı bloğunda 10 dakika boyunca denatüre edilip hemen buz içine alındı.

2. PZR ürünleri denatüre edilirken, membran 250 ml 2x SSPE/%0.1 SDS ile 60°C'da 5 dakika yıkandı.

3. Miniblotter'in alt kapağına sünger yastığı yerleştirilip, plastik penset yardımıyla kesik kısmı sol üst köşeye gelecek şekilde üzerine membran yerleştirildi.

4. Miniblotter'in üst kapağı kapatılıp kapiller içindeki rezidüel sıvı aspire edildi.

5. 150 µl denatüre edilmiş örnek kapillere yüklendi ve 60°C'da 1 saat inkübe edildi.

6. Inkübasyon sonunda kapillerdeki tüm sıvı aspire edildi. 250 ml 2xSSPE/%0.5 SDS ile iki kez 60°C'da 10 dakika yıkandı.

7. Membran sıcaklığı oda ısısına düşüncü, membran üç tarafı kapatılmı effaf po et dosya içine alındı. Üzerine 10 ml 2xSSPE/%0.5 SDS ve 10 µl streptavidin horseradish peroksidaz (500 U/ml) eklendi. Hava kabarcıkları uzakla tırdıktan sonra po et dosyanın açık kenarı plastik kapatıcı yardımıyla kapatıldı. 42°C’da 1 saat inkübe edildi.

8. Membran iki defa 250 ml 2xSSPE %0.5 SDS ile 42°C’da 10 dakika sürelerle yıkandı.

9. Membran iki defa 250 ml 2xSSPE ile oda ısısında 5 dakika sürelerle yıkandı. Bu i lemler bitince görüntü almak için karanlık odaya geçildi.

10. Membran ka ıt havlu üzerine alındı.

11. Plastik kap içinde ECL Detection Reagent 1 ve ECL Detection Reagent 2 e it miktarda karı tırılıp, membranın tüm yüzeyine temas edecek ekilde 1 dakika çalkalandı.

12. Membran plastik dosya arasına alınıp, hava kabarcı ı kalmayacak ekilde etrafı kapatıldı.

13. Membran birinci film kasetinde 1 dakika bekletildikten sonra, ikinci film kasetine alındı. Birinci filmin ı ma iddetine göre ikinci kasetin bekleme süresi belirlendi.

3.4.3.2. Yorumlama:

Membran X-ray filmiyle muamele edildikten sonra hibridize olan “spacer” lar membranda siyah noktalanmalar olu turdu. Hibridize olmu “spacer” ın varlı ı pozitif sinyal, “spacer” hibridizasyonunun olmaması ise negatif sinyal olarak de erlendirildi. Her bir su için elde edilen spoligopaternalerin ikili veya oktal de erleri SpolDB4 veri tabanına girilerek su un SIT numarası, kümeler ve familyalar belirlendi.

Database adres:

<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo>

Spoligotiplendirme sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılanımız Oktal kod anahtarı

= 0	= 1	= 2	= 3
= 4	= 5	= 6	= 7
Spacer 43	= 1	= 0	

Not: Açık kutular hibridizasyon olmadığını, koyu kutular hibridizasyon varlığını gösterir.

3.4.3.3. Spoligotiplendirme Metodunda Kullanılan Çözeltiler

Spooligotiplendirme metodunda kullanılan çözeltiler laboratuvarımızda aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

0.5 M Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA pH 8.0)

EDTA (dihidrat) 186.12 gr. alınıp

dH₂O 1000ml'e tamamlandı.

pH 8.0' a ayarlanıp otoklavlandı.

20mM EDTA (pH 8.0)

dH₂O 960 ml

0.5 M EDTA 40ml

20XSSPE (Sodyum klorür, Sodyum fosfat, EDTA)

0.2 M Na₂HPO₄ (dihidrat) 35.6gr/L

3.6 M NaCl 210.24gr/L

0.5 M EDTA 40ml

dH₂O 960 ml (Otoklavlandı)

2XSSPE

20xSSPE 100ml

dH₂O 960ml

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

100gr Sodyum Dodesil Sülfat, önceden 60°C'a ısıtılmış dH₂O kullanılarak toplam hacim 1000 ml'e tamamlandı.

%1 (SDS)

dH₂O 900 ml

%10 SDS 100ml

2xSSPE/%0.1 SDS

dH₂O 890ml

20xSSPE 100ml

%10 SDS 10ml

2xSSPE/%0.5 SDS

dH₂O 850ml

20xSSPE 100ml

%10 SDS 50ml

3.4.2. MIRU-VNTR

MIRU-VNTR yönteminin uygulanmasında Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda kullanılan protokol takip edilmiştir. Bu çalışmada 24 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanıldı (73). Hedeflenen MIRU lokusları için belirtilen primerler sentezletildi (Tablo1). Floresanla işaretli

oligonükleotid pimerler kullanılarak sekiz farklı multipleks PZR karı ımıyla MIRU-VNTR lokuslarının amplifikasyonu yapıldı (Tablo2). Amplifikasyon ürünleri elektroforeze tabi tutularak her bir lokustaki PZR ürünlerinin büyüklü üne göre MIRU alellerinin sayısı belirlendi (Tablo3). Amplifikasyon i leminde pozitif kontrol olarak H37Rv, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı. *M. tuberculosis* H37Rv su undan ekstrakte edilmi DNA kalite kontrolü olarak kullanıldı. Sonuçlar uyumsuz çıktı ında fragment analizi kontrol örne i (PN608105, Beckman Coulter) kullanılarak cihaz kontrolü yapıldı.

3.4.2.1. Amplifikasyon Karı ımlarının Hazırlanması

A a ıdaki tabloya (Tablo1) uygun ekilde sekiz farklı multipleks PZR amplifikasyon karı ımı genomik DNA eklenmeden kısa bir süre önce hazırlandı. PZR tüplerine da ıtıldı. Daha sonra tüpler amplifikasyon odasına ta ınarak 1:50 sulandırılmı DNA'dan 5 µl ilave edildi.

Hazırlanan reaksiyon karı ımı ile hedef lokuslar a a ıdaki amplifikasyon ko ulları kullanılarak ço altıldı.

95°C	15 dakika	
94°C	1dakida	} 40 döngü
59°C	1dakika	
72°C	1.5 dakika	
72°C	10dakika	
4°C	Beklet	

Tablo 1: MIRU lokusları ve kullanılan primer dizilimleri (73)

<i>PZR miks</i>	<i>lokus</i>	<i>Primer dizileri (5'→3')</i>
<i>Miks 1</i>	MIRU 4	GCGCGAGAGCCCCTGAACTGC (5.DYD2) GCGCAGCAGAAACGCCAGC
	MIRU26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (5.CY5.5)
	MIRU40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (5.CY5.5) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
<i>Miks 2</i>	MIRU 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (5.DYD2)
	MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCCTCGTGCAGCCCTGGTAC (5.CY5.5)
	MIRU 31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (CY5)
<i>Miks 3</i>	VNTR 42/MTUB 04	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC (5.DYD2)
	VNTR 43/ETR-C	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT (5.CY5.5) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
	ETRA	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (CY5) CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATT
<i>Miks 4</i>	VNTR 47/MTUB 30	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (5.DYD2) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
	VNTR 52/MTUB 39	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (5.CY5.5) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
	VNTR 53/QUB-4156C	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (CY5)

Tablo 1 Devamı

<i>PZR miks</i>	<i>lokus</i>	<i>Primer dizileri (5'→3')</i>
<i>Miks 5</i>	QUB-11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (5.DYD2)
	MTUB21/VNTR1995	AGATCCCAGTTGTCTCGTC (5.CY5.5) CAACATCGCCTGGTTCTGTA
	QUB-26	AACGCTCAGCTGTCGGAT (CY5) CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT
<i>Miks 6</i>	MIRU 2	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT (5.DYD2)
	MIRU 23	CTGTCTGATGGCCGAACAAAACG (5.CY5.5) AGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTCT
	MIRU 39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (CY5)
<i>Miks 7</i>	MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (5.DYD2) GGAGACCGCGACCAGGTA
	MIRU 24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (5.CY5.5)
	MIRU 27/QUB 5	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (CY5)
<i>Miks 8</i>	MTUB 29/VNTR 46	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT (5.DYD2) AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
	ETR-B/VNTR 48	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (5.CY5.5) CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
	MTUB 34/VNTR 49	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA (CY5) GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC

Tablo 2: MIRU-VNTR PZR amplifikasyon karışımları (73)

PZR karışım no:	PZR miks 1	PZR miks 2	PZR miks 3	PZR miks 4	PZR miks 5	PZR miks 6	PZR miks 7	PZR miks 8
MgCl ₂ final kons.	3 mM	2 mM	1.5 mM	3 mM	1.5 mM	2.5 mM	1.5 mM	2 mM
H ₂ O	16 µl	18 µl	19 µl	16 µl	19 µl	17 µl	19 µl	18 µl
10x PZR tamponu	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
DMSO	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
MgCl₂ 25 mM	6 µl	4 µl	3 µl	6 µl	3 µl	5 µl	3 µl	4 µl
dNTP 10 mM	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Primer karışımı (her bir primerden 1 µl)	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
HotStart DNA pol (5 U/ µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
DNA	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Total	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Primer karışımı (her bir primer konsantrasyonu 10 pmol / µl)	MIRU4 F ETR D R	MIRU 10F MIRU 10R	Mtub04 F Mtub04 R	Mtub 30 F Mtub 30 R	QUB-11b F QUB-11b R	MIRU2 F MIRU2 R	MIRU 20 F MIRU 20 R	Mtub29 F Mtub 29 R
	MIRU26 F MIRU 26R	MIRU 16F MIRU 16R	ETR C F ETR C R	MIRU 39 F MIRU 39 R	Mtub21 F Mtub21 R	MIRU 23 F MIRU 23 R	MIRU 24 F MIRU 24 R	ETR B F ETR B R
	MIRU 40F MIRU 40R	MIRU 31 F ETR E R	ETR A F ETR A F	OUQ-4156 F QUB-4156 R	QUB-26 F QUB-26 R	MIRU 39 F MIRU 39 R	MIRU 27 F QUB-5 R	Mtub34 F Mtub 34 R

3.4.2.2. Amplifikasyon Sonrası Cihaza Yükleme İşlemleri ve Fragman Analizi:

1.PZR ürünü 1/5 oranında sulandırıldı.

2.5 µl sulandırılmış PZR ürünü, 20 µl SLS ve 0.5 µl “MapMarker” (1000 lik, BioVentures, Inc USA) karışımı hazırlandı.

3.Örnekler mikropłaka yüklendi ve üzerlerine birer damla mineral yağ damlatıldı.

4.Sekans cihazında VNTR programında çalıştırıldı.

5.Program:Kapiller sıcaklığı: 50°C, Denatürasyon sıcaklığı: 90°C, Denatürasyon süresi: 120 saniye, injeksiyon akımı: 2.0 kV, injeksiyon süresi: 20 saniye, Ayrı tırma akımı: 30 kV, Ayrı tırma süresi: 180 dakika.

6.“MapMarker” referans alınarak Beckman Coulter cihazındaki Fragment analiz programı yardımıyla her bir lokustaki PZR ürününün büyüklüğü saptandı.

7.Aşağıdaki tablodan (Tablo 3) yararlanarak her bir MIRU lokusunun tekrar sayısı belirlendi. Bu rakamlar kullanılarak o sığaya ait MIRU-VNTR formülü çıkartıldı.

Tablo 3: MIRU lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve ampikon boyutları bç (73)

	Lokus	Amplikon Boyutu (bç)	
		0 tekrar	Tekrarlayan birim uzunlu u (b.ç)
Mix3	Mtub04	537	51
	ETR C	171	58
	ETR A	195	75
Mix5	QUB 11b	67	69
	Mtub21	116	57
	QUB 26	153	111
Mix7	MIRU 20	437	77
	MIRU 24	395	54
	MIRU 27	498	53
Mix2	MIRU 10	482	53
	MIRU 16	565	53
	MIRU 31	492	53
Mix8	Mtub29	335	57
	ETR B	347	57
	Mtub34	326	54
Mix6	MIRU 2	402	53
	MIRU 23	150	53
	MIRU39	540	53
Mix1	MIRU 4	122	77
	MIRU 26	285	51
	MIRU 40	354	54
Mix4	Mtub30	252	58
	Mtub39	540	53
	QUB 4156	563	59

3.5. ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Etik Kurulu tarafından 01.04.2013 tarihinde 08/03 karar no ile etik kurul onayı almıştır.

Sekans verilerinin analizi yapıldı ında, mutasyon analizi yapılan 52 izolattan 51'inde (%98) *rpoB* gen bölgesinde mutasyon saptandı. Otuz (%57.6) izolatta 531. kodonda, onikisinde (%23) 516. kodonda, dokuzunda (%17.3) 526. kodonda, ikisinde (%3.8) 511. kodonda, birer izolatta (%1.9) 515 ve 522. kodonda mutasyon kaydedildi. *rpoB* gen bölgesinde olu an aminoasit de i iklikleri tablo 4'de görölmektedir.

Tablo 4: 52 *M. tuberculosis* su unda *rpoB* geninde saptanan mutasyonlar

İZOLAT NUMARASI	<i>rpoB</i> -531 TCG(Ser)	<i>rpoB</i> -526 CAC(His)	<i>rpoB</i> -516 GAC(Asp)	<i>rpoB</i> -522 TCG(Ser)	<i>rpoB</i> -511 CTG(Leu)	<i>rpoB</i> -515 ATG(Met)
1	TTG(Leu)					
2		GAC(Asp)				
3	TTG(Leu)					
4	TTG(Leu)					
5	TTG(Leu)					
6	TTG(Leu)					
7	TTG(Leu)					
8	TTG(Leu)					
9			GTC(Val)			
10	TTG(Leu)					
11						
12	TTG(Leu)					
13	TTG(Leu)					
14	TTG(Leu)					
15			GTC(Val)			
16		GAC(Asp)				
17			GTC(Val)			
18			TAC(Tyr)		CGG(Arg)	
19	TTG(Leu)					
20	TTG(Leu)					
21	TTG(Leu)					
22			GAA(Glu)	TTG(Leu)		
23	TTG(Leu)					
24			GTC(Val)			

25	TTG(Leu)					
26	TTG(Leu)					
27	TTG(Leu)					
28	TTG(Leu)					
29			GAG(Glu)			
30	TTG(Leu)					
31	TTG(Leu)					
32	TTG(Leu)					
33		TAC(Tyr)				
34		AAC(Asn)				
35			TAC(Tyr)			AGC(Ser)
36		TGC(Cys)				
37	TTG(Leu)					
38	TTG(Leu)					
39	TTG(Leu)					
40		TAC(Tyr)				
41	TTG(Leu)					
42	TTG(Leu)					
43	TTG(Leu)					
44		GGC(Gly)				
45			TAC(Tyr)			
46			GTC(Val)			
47	TTG(Leu)					
48			TAC(Tyr)			CGG(Arg)
49		TAC(Tyr)				
50			GTC(Val)			
51		CGC(Arg)				
52	TTG(Leu)					

Tablo 5: INH Dirençli 52 *M. tuberculosis* su unda *katG* ve *inhA* genlerinde saptanan mutasyonlar

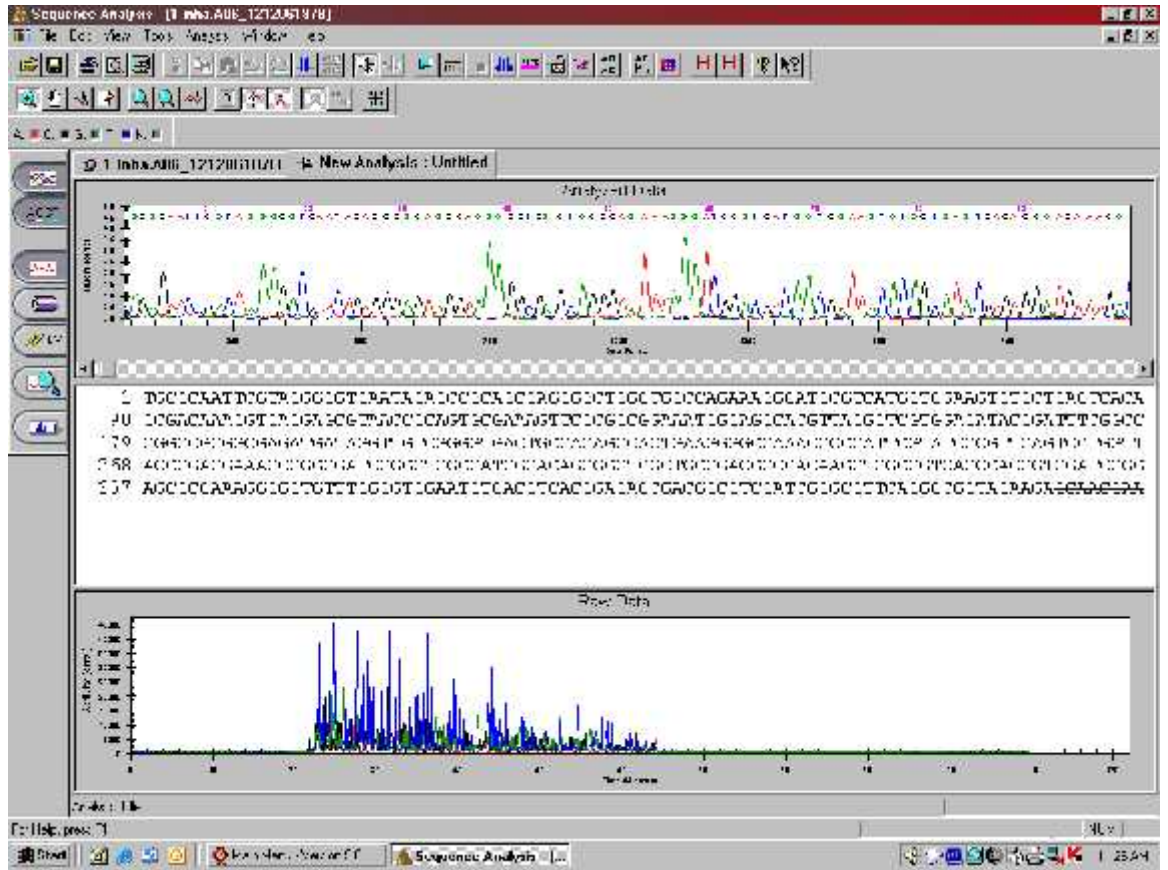
ZOLAT NUMARASI	<i>katG</i> -315 AGC(Ser)	<i>katG</i> -273 GGT(Gly)	<i>inhA</i>
1	—		C(-15)→ T
2	ACC(Thr)		
3	ACC(Thr)		
4	ACC(Thr)		
5	ACC(Thr)		
6	ACC(Thr)		C(-15)→ T
7	ACC(Thr)		
8	ACC(Thr)		
9	ACC(Thr)		
10	—		C(-15)→ T
11	ACC(Thr)		
12	ACC(Thr)		C(-15)→ T
13	ACC(Thr)		
14	ACC(Thr)		
15	ACC(Thr)		
16	ACC(Thr)		
17	ACC(Thr)		
18	ACC(Thr)		
19	—		C(-15)→ T
20	ACC(Thr)		
21	ACC(Thr)		C(-15)→ T
22	ACC(Thr)		
23	ACC(Thr)		
24	ACC(Thr)		
25	—		C(-15)→ T
26	ACC(Thr)		C(-15)→ T
27	ACC(Thr)		C(-15)→ T
28	ACC(Thr)		C(-15)→ T
29	—		
30	ACC(Thr)		C(-15)→ T
31	ACC(Thr)		
32	—	AGT(Ser)	
33	ACC(Thr)		
34	—		C(-15)→ T
35	ACC(Thr)		
36	ACC(Thr)		
37	ACC(Thr)		C(-15)→ T
38	ACC(Thr)		
39	ACC(Thr)		C(-15)→ T
40	ACC(Thr)		
41	ACC(Thr)		
42	ACC(Thr)		

Tablo 5 Devamı

43	ACC(Thr)		
44	ACC(Thr)		C(-15)→ T
45	ACC(Thr)		
46	ACC(Thr)		
47	ACC(Thr)		
48	ACC(Thr)		
49	ACC(Thr)		
50	ACC(Thr)		
51	—		
52	ACC(Thr)		

4.2.3. zoniazid Direnç Mutasyonları *inhA* Geni:

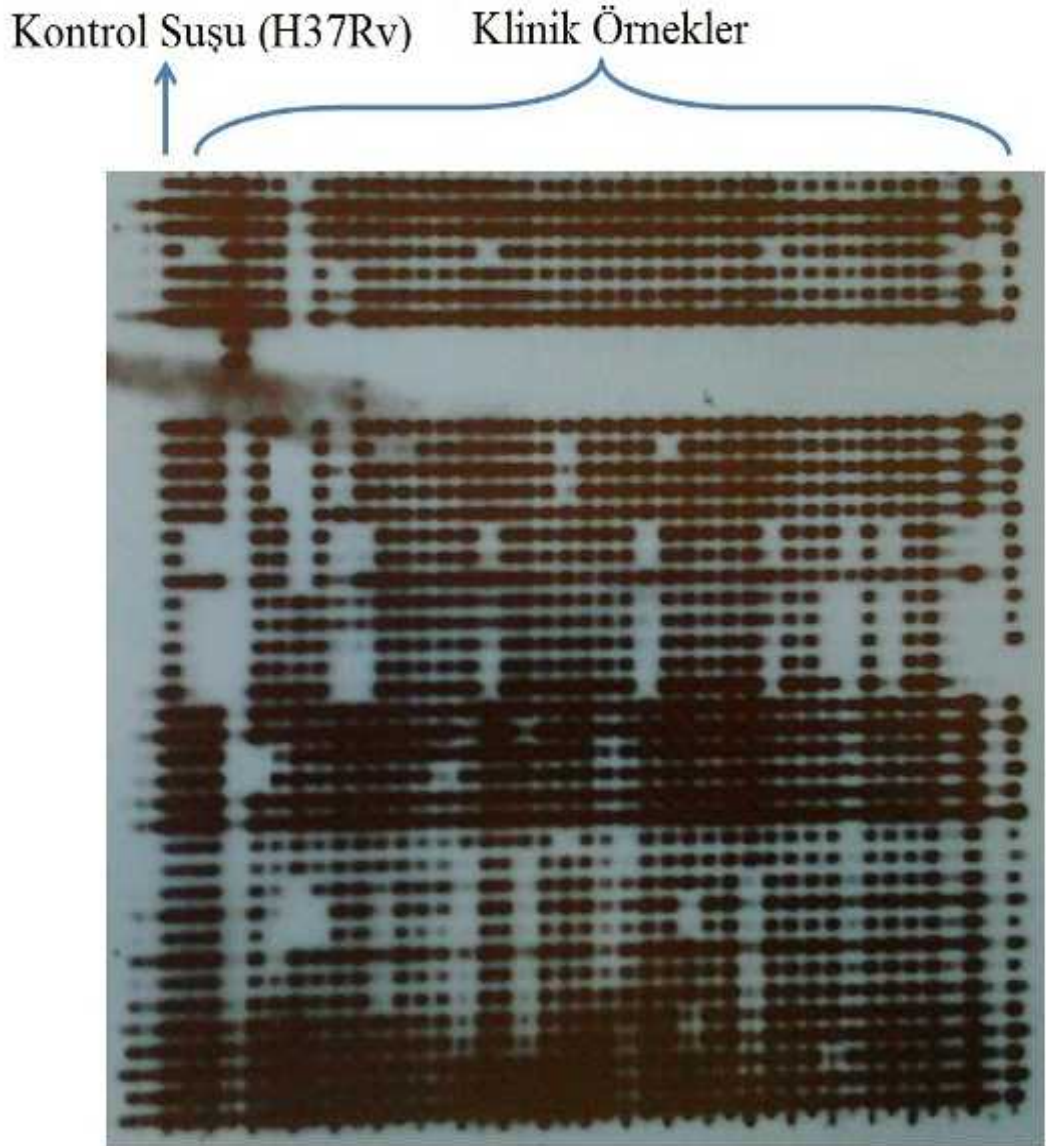
DNA dizi analizi yapılan su ların tamamında *inhA* promoter gen bölgesinin dizilimi saptandı. ekil 12’de çalı mamızdan elde edilen, bir örne e ait elektroferogram görüntüsü bulunmaktadır. Su ların 15’inde (%28.8) *inhA* promoter gen bölgesinde C(-15)T mutasyonu saptanmı tır (Tablo 5).



ekil 12: *inhA* gen bölgesine ait örnek elektroferogram.

4.2.4. Spoligotiplendirme

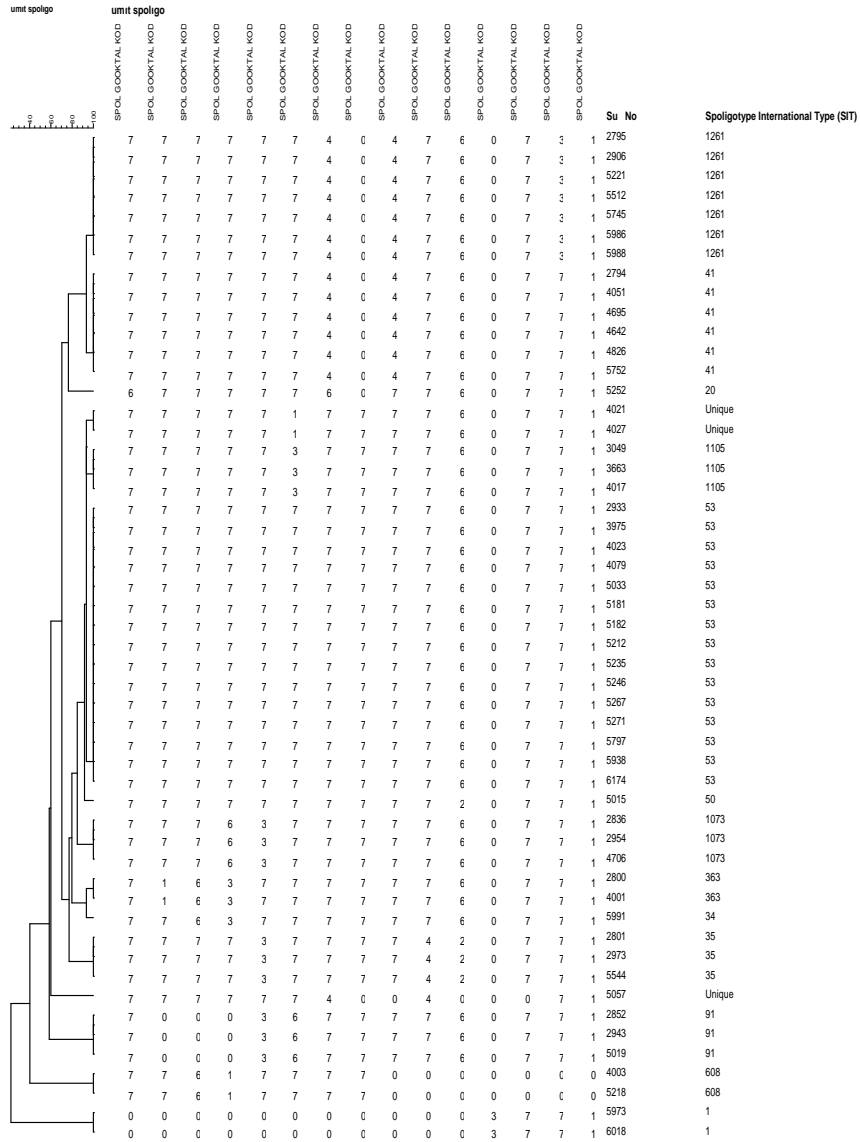
Spoligotiplendirme membranı üzerindeki 43 “spacer” ın hibridizasyon olması (siyah renk olu ması veya renksiz olması) durumuna göre her bir su a özgü 15 rakamdan olu an oktal kodlar belirlendi. Bu kodlar kullanılarak kümeleme, SIT ve major familyalar belirlendi.



ekil 13: Çalı mamıza ait Spoligotiplendirme membranının görüntüsü: Siyah noktalar ilgili bölgede “spacer” varlı ını, renksiz noktalar “spacer” yoklu unu gösterir.

4.2.4.1. Kümeleme:

Elli iki *M.tuberculosis* suunun spoligotiplenme profilleri çıkartıldı. On be farklı spoligotipi saptanmış olup bunlardan 11 tanesi küme oluşturan su ları bulundurmaktadır. Toplam 48 su (%92.3) küme içerisinde yer almıştır (ekil 14).



ekil 14: Spoligotiplendirme yapılan 52 su un dendrogramı. Küme oluşturan su lar aynı SIT numarasıyla gösterilmiştir.

4.2.4.2. Spoligo Paterni:

4.2.4.2.1. Spoligo International Type (SIT): 52 *M. tuberculosis* su undan 13 farklı SIT saptandı. Üç su özgü olup SpolDB4 veri bankasından herhangi bir SIT numarasıyla elemedi. Diğer suların SIT numaralarına göre dağılımı Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6: 52 *M. tuberculosis* su unda saptanan spoligotipler (SIT)

SPOL GOT P (SIT)	SU SAYISI (%)
53	15 (%28.8)
1261	7 (%13.4)
41	6 (%11.5)
1105	3 (%5.7)
91	3 (%5.7)
35	3 (%5.7)
1073	3 (%5.7)
608	2 (%3.8)
363	2 (%3.8)
1	2 (%3.8)
20	1 (%1.9)
50	1 (%1.9)
34	1 (%1.9)
ÖZGÜ	3 (%5.7)

4.2.4.2.2. Spoligofamilya: Çalı maya dahil edilen 52 *M. tuberculosis* izolatından 21’inin (%40,3) T ailesinden, 14’ünün (%26.9) Latin Amerika-Akdeniz ailesinden, dörünün Haarlem (%7.6) ailesinden, üçer suun (%5.7) X ve S ailelerinden, iki er suun (%3.8) Beijing ve U ailelerinden oluştuğu görüldü. Üç su (%5.7) özgü profil sergilemiştir. Major familya grupları Tablo 7’de ve bunların alt grupları ekil 15’de verilmiştir.

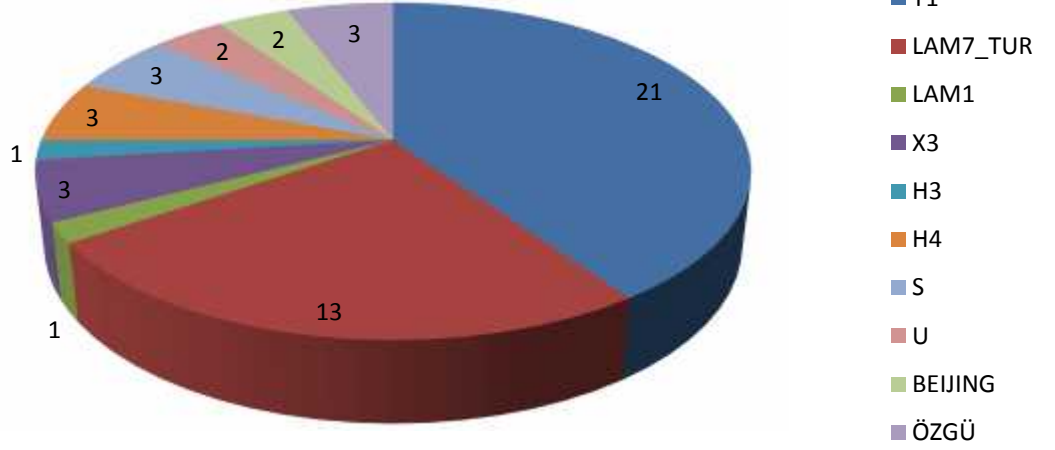
Tablo 7 :Major Spoligofamilyaların dağılımı

MAJOR SPOLIGOFAMILYALAR	SU SAYISI
T	21 (%40.3)
LAM	14 (%26.9)
H	4 (%7.6)
X	3 (%5.7)
S	3 (%5.7)
U	2 (%3.8)
BEIJING	2 (%3.8)
ÖZGÜ	3 (%5.7)

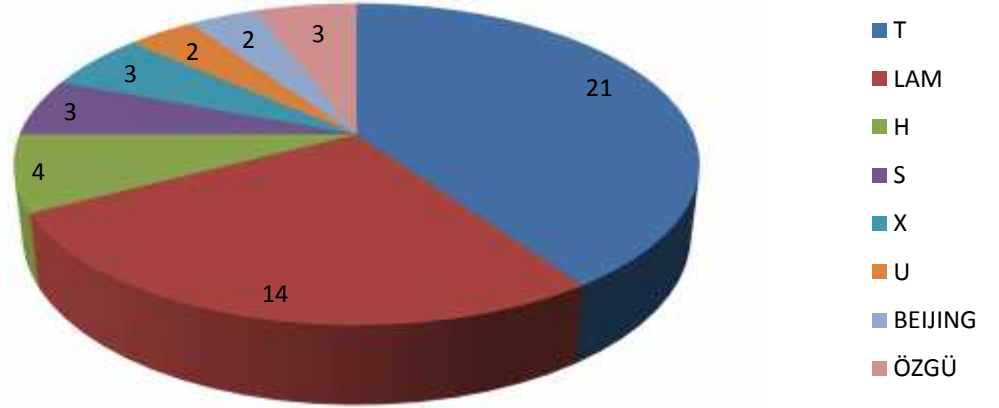
LAM: Latin Amerika-Akdeniz, H: Haarlem

A

Suş Sayıları



Suş Sayıları

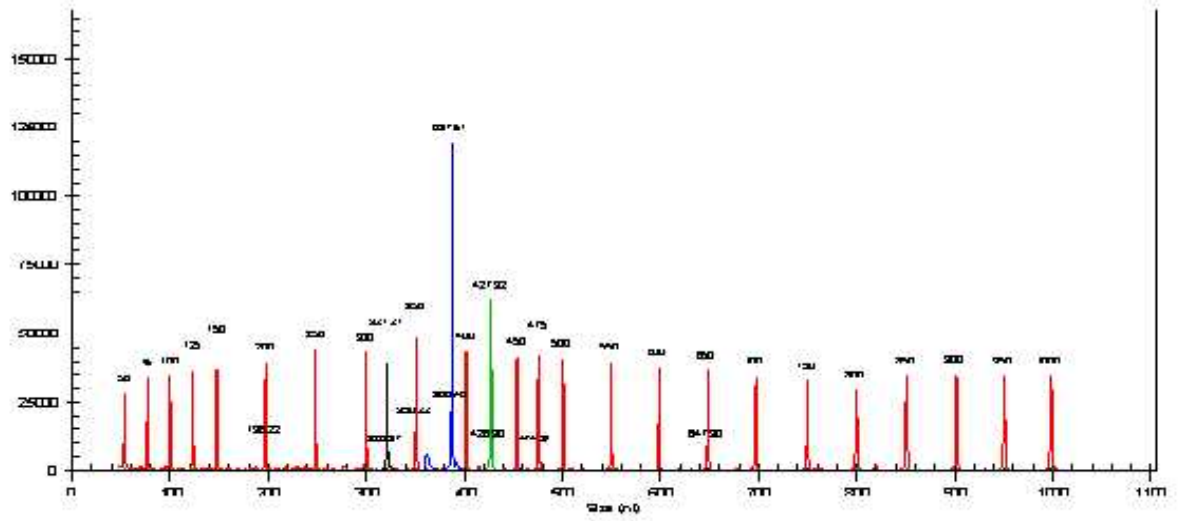


ekil 15: Spoligofamilyaların pasta grafi inde gösterilmesi. A: LAM ve H major gruplarının alt familyaları gösterilmi tir. B: ekilde familyalar major gruplar halinde verilmi tir.

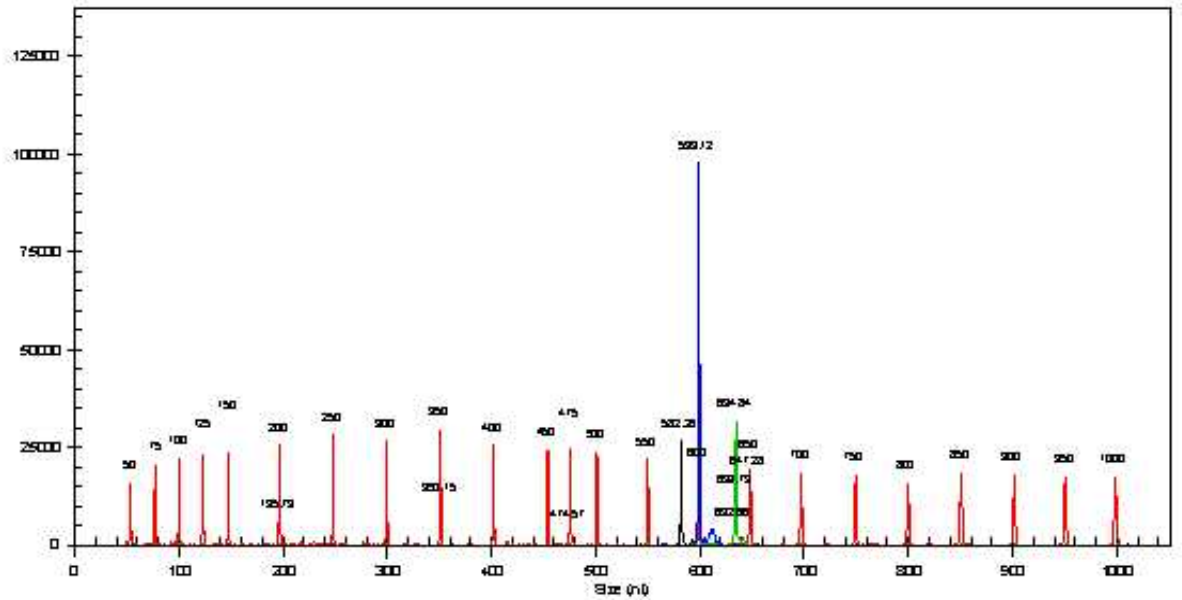
4.2.3. MIRU-VNTR

Her bir su a ait sekiz ayrı multipleks PZR uygulamasının oldukça açık ve de erlendirilebilir elektroferogramlar verdi i görüldü (ekil 16-23). Kırmızı ile i aretli moleküler a ırlık standart yardımıyla her bir multipleks PZR karı ımı içerisinde yer alan lokusların bant büyüklükleri hesaplandı. Lokus büyüklüklerinden 24 rakamdan olu an MIRU-VNTR profili belirlendi. Her bir su a ait MIRU-VNTR verileri kullanılarak Gel Compair'in Numerik De erler programıyla ekil 24'deki dendogram olu turuldu. Su lar arasındaki kümeleme belirlendi.

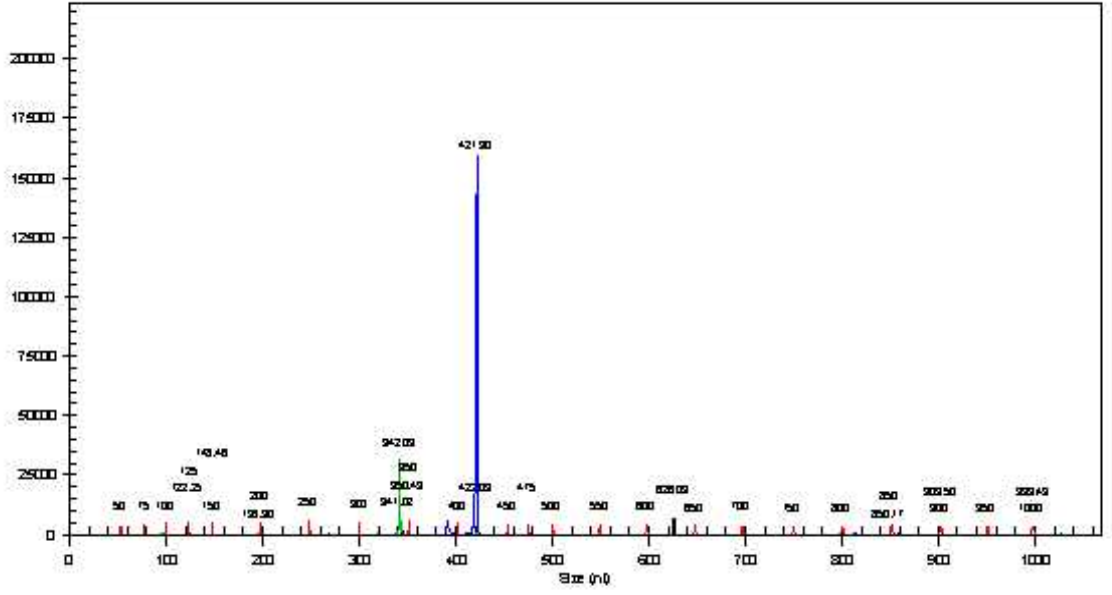
MIRU-VNTR yöntemiyle tiplendirmesi yapılan 52 *M. tuberculosis* su undan 49 farklı genotip saptandı. Bu genotiplerden üç tanesi küme olu turan su ları içermektedir. Toplam 6 su (%11.5) küme içerisinde yer aldı (ekil 24).



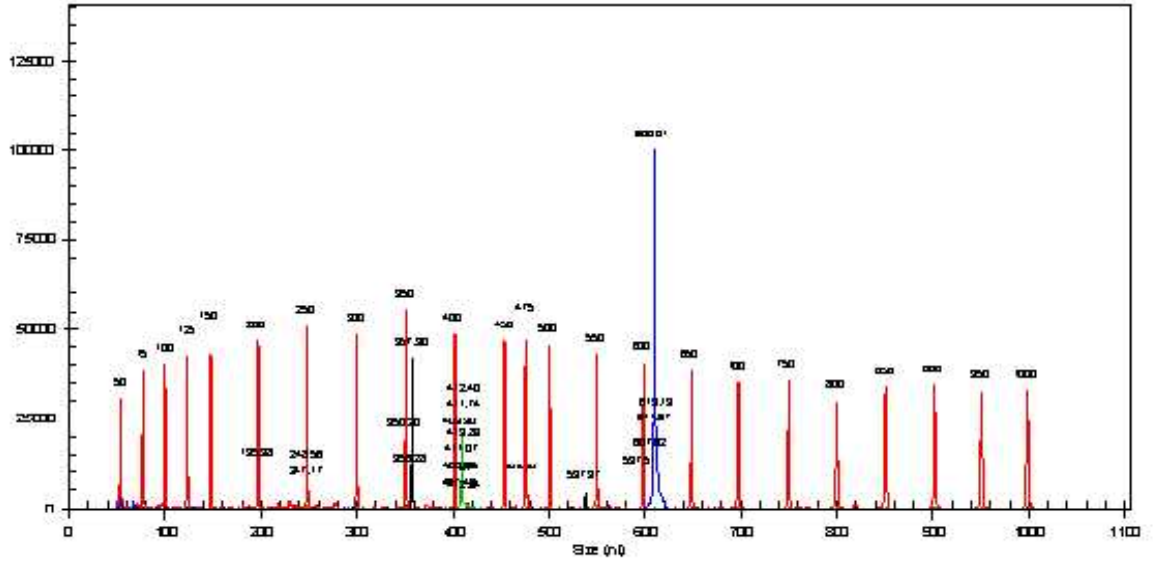
ekil 16: M X 1 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü: Kırmızı renk marker'ı, ye il renk lokus MIRU26'yı, siyah renk lokus MIRU 4'ü, mavi renk lokus MIRU40'ı göstermektedir



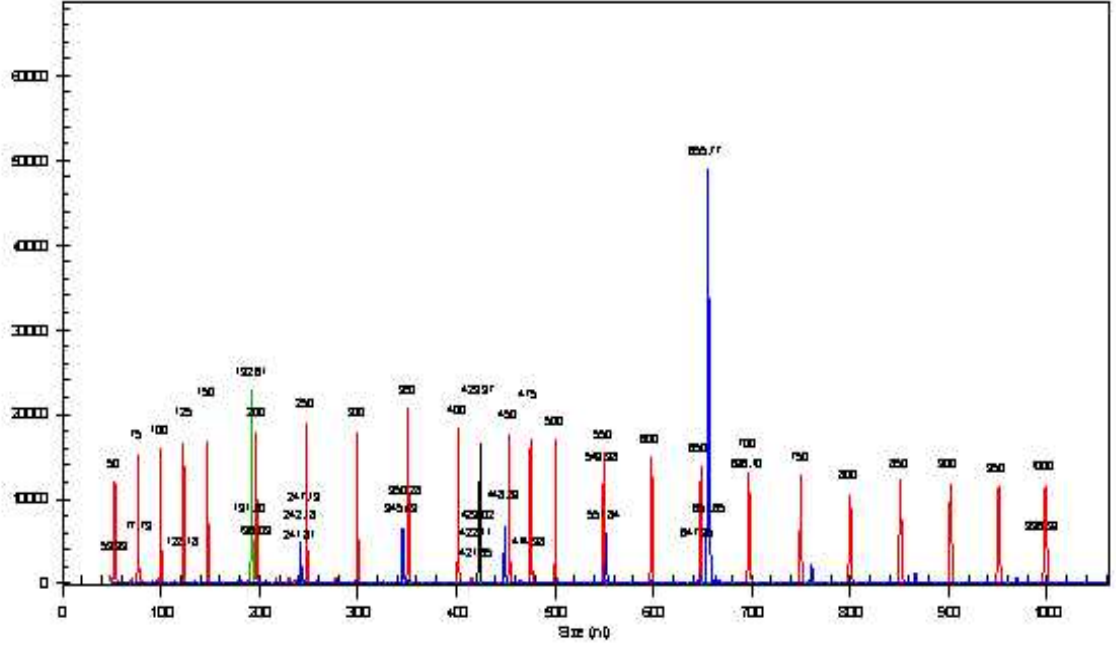
ekil 17: M X 2 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü: Kırmızı renk marker'ı, ye il renk lokus MIRU16'yı, siyah renk lokus MIRU 10'u, mavi renk lokus MIRU 31'i göstermektedir.



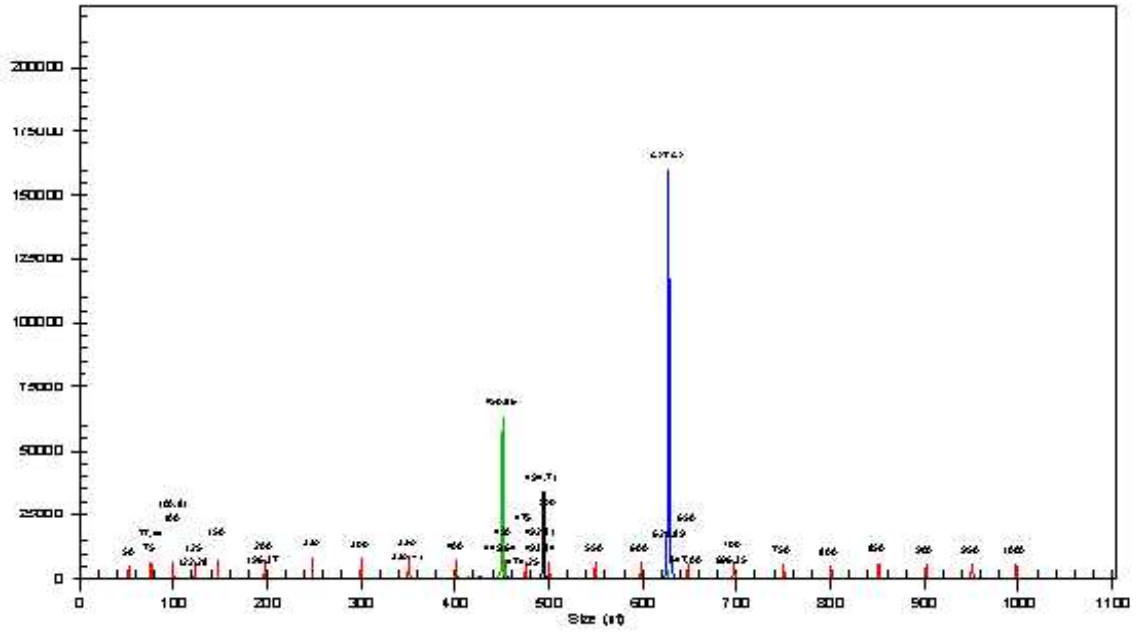
ekil 18: M X 3 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü: Kırmızı renk marker'ı, ye il renk lokus VNTR 43/ETR-C'yi, siyah renk lokus VNTR 42/MTUB 04'ü, mavi renk lokus ETRA'yı göstermektedir.



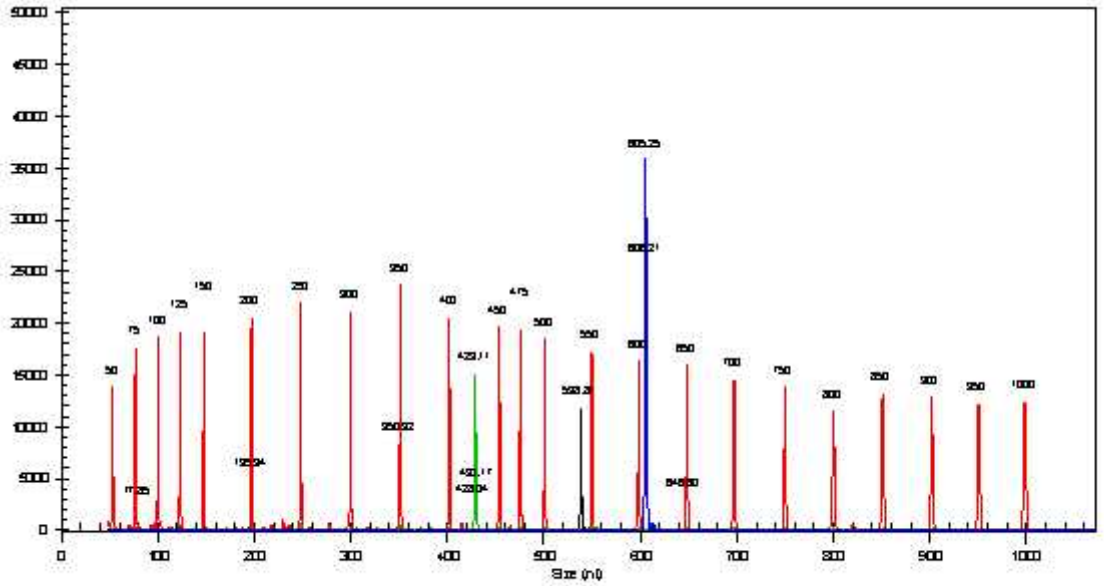
ekil 19: M X 4 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü: Kırmızı renk marker'ı, ye il renk lokus VNTR 52/MTUB 39'u, siyah renk VNTR 47/MTUB 30'u, mavi renk VNTR 53/QUB-4156C'yi göstermektedir.



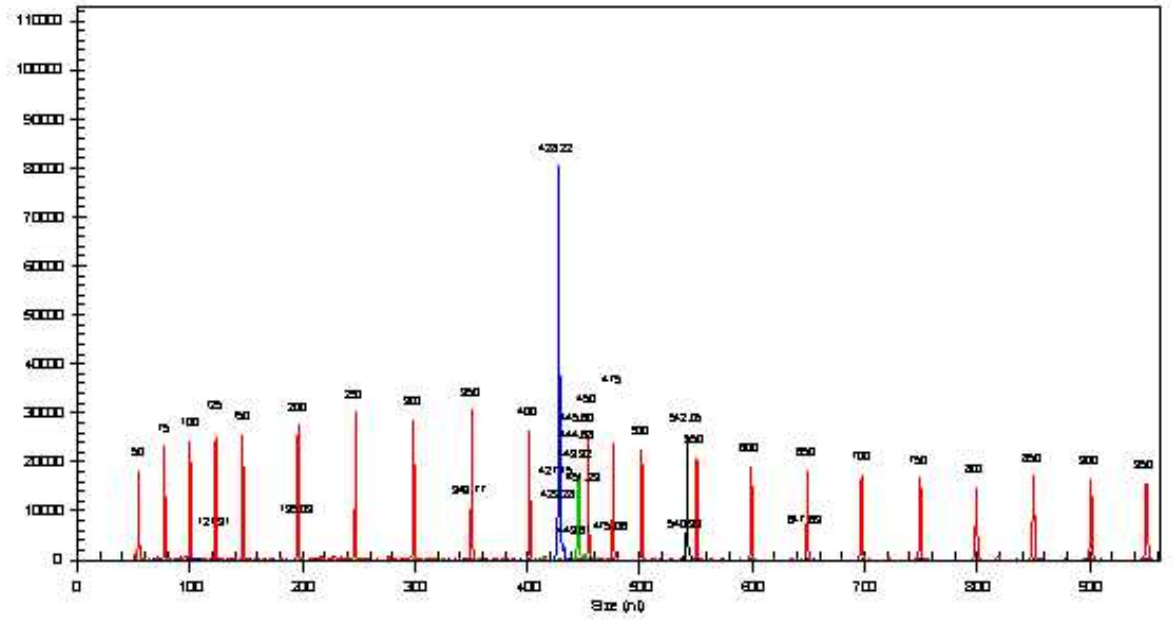
ekil 20: M X 5 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü: Kırmızı renk marker'ı, ye il renk lokus MTUB21/VNTR1995'i, siyah renk lokus QUB-11b'i, mavi renk QUB-26'yı göstermektedir.



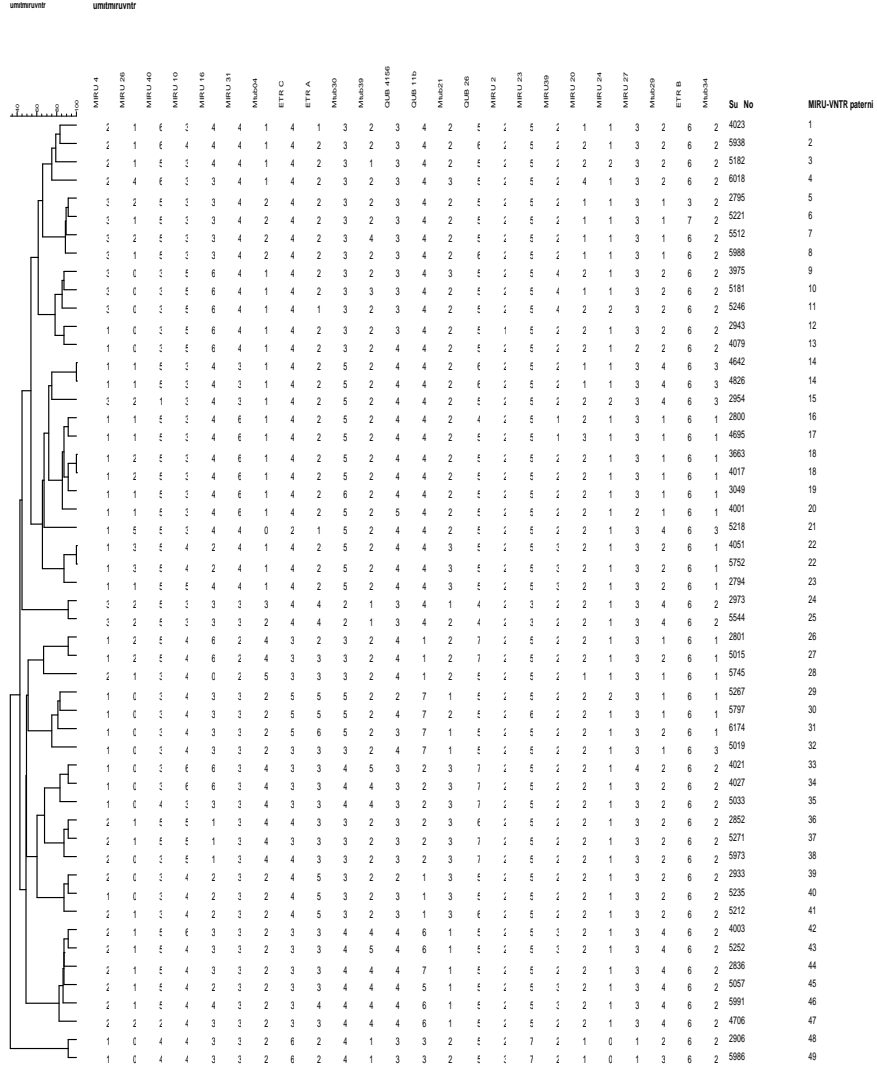
ekil 21: M X 6 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü: Kırmızı renk marker'ı, ye il renk lokus MIRU23'ü, siyah renk lokus MIRU 2'yi, mavi renk MIRU39'u göstermektedir.



ekil 22: M X 7 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü: Kırmızı renk marker'ı, ye il renk lokus MIRU24'ü, siyah renk lokus MIRU 20'yi, mavi renk MIRU 27/QUB 5'i göstermektedir.



ekil 23: M X 8 MIRU-VNTR elektroferogram görüntüsü: Kırmızı renk marker'ı, ye il renk lokus ETR-B/VNTR 48'i, siyah renk lokus MTUB 29/VNTR 46' yı, mavi renk MTUB 34/VNTR 49'u göstermektedir.



ekil 24: 52 su a ait MIRU-VNTR sonuçlarının dendogramı. Aynı profili gösteren su lara ortak numara verilmi tir.

TARTI MA

Tüberkülozun kontrolünde direncin kısa sürede gösterilmesi ve hastalar arasındaki çapraz bula ın ortaya konulması en önemli uygulamalardır. Direncin mekanizmasının moleküler düzeyde irdelenmesi hızlı tanı amacıyla geli tirilecek olan testlere temel bilgi olu turması yanında direncin seviyesi hakkında önemli bilgiler vermektedir. Ç D tüberküloz su larında RIF ve INH direncinden sorumlu mutasyonların belirlenmesi, dirençli su lar arasındaki çapraz bula derecesinin aydınlatılması ve dirençli kökenlerin filogenetik analizinin ortaya konulması amacıyla yapılmı olan bu çalı manın ana bulguları unlardır. RIF dirençli su ların %98'inde *rpoB* gen bölgesinde mutasyon saptandı. INH dirençli su ların %86.5' inde *katG* gen bölgesinde yüksek düzey dirençten sorumlu mutasyon saptandı. Su ların %28.8'inde *inhA* promoter gen bölgesinde mutasyon tespit edildi. Spoligotiplendirme sonucunda SIT53, SIT1261, SIT41 en sık görülen üç spoligotip olarak belirlendi. Su ların %67.3'ü T ve LAM major familyaları içerisinde yer almaktadır. Ç D su ları arasında çapraz bula derecesinin dü ük oldu u (%11.5) görüldü.

Çalı mamızda mutasyon analizi yapılan izolatların (%98)'inde *rpoB* gen bölgesinde mutasyon saptanmı olup sıklıkla 531. (%57.6), 516. (%23), 526. (%17.3) kodonlarda de i imler belirlenmi tir. Ayrıca daha dü ük oranlarda 511, 515, 522. kodonlarda mutasyon kaydedilmi tir. *rpoB* gen bölgesinde olu an en sık aminoasit de i ikli i Ser531Leu aminoasidi de i ikli i (%57.6) olarak belirlenmi tir. Bazı su larda ise Asp516Val, Asp516Tyr, Asp516Glu, His526 Asp, His526Tyr, His526Cys, His526Gly, His526Arg, His526Asn, Ser522Leu, Leu511Arg, Met515Ser de i imi tespit edilmi tir. Bu konuda yapılan ulusal ve uluslararası çalı malarda farklılıklar göze çarpmaktadır. Ülkemizde yapılan çalı malarda RIF direncinden sorumlu en yaygın mutasyonun 531. kodonda (%47-%56) oldu u onu 516. kodon (%6-%23) ve 526. kodondaki (%13-%19) mutasyonların izledi i gözlemlenmi tir (57,74,75).

Otkun ve arkadaşlarının 2003 yılında Edirne'den bildirdi i çalı mada izolatların % 18.5'inde *rpoB* geninde mutasyon saptanamamı tir. En sık mutasyonlar

531. (%53.3), 526. (%13) ve 516. kodonlarda (%6.5) tespit edilmiştir. En sık görülen amino asit de ikili i Ser531Leu (% 50) olarak kaydedilmiştir. Bu çalışmada ayrıca Ser531Leu ve Thr480Ala, Ser531Leu ve Glu504Gly, His526Asn ve Met515Val, His526Arg ve Thr508Ile ikili mutasyonları da bildirilmiştir. Buna benzer olarak incelediğimiz suşların %7.6'sında *rpoB* geninin iki ayrı kodonunda eş zamanlı mutasyonlar kaydedildi (74).

Çavuşoğlu ve arkadaşlarının İzmir'den 2002 yılında bildirdiği farklı hastalardan elde edilen 41 RIF dirençli izolatı içeren çalışmada; *rpoB*'nin 531. (%56.1), 526. (%19.5) ve 516. (%7.3) kodonlarında mutasyon saptanmıştır. En sık görülen aminoasit de ikili i izolatların 19'unda (46.3%) saptanan Ser531Leu de ikimi olmuştur. Daha düşük oranlarda Ser531Trp, His526Tyr, His526Asp, His526Arg, His526Cys, Asp516Val, Asp516Tyr, Ser522Trp, Gln490His, Gln513Pro, Met515Ile mutasyonları belirlenmiş ve bir izolatta 514-515. kodonlar arasında CGG insersiyonu (Arg de ikimi) tespit edilmiştir (75).

Aktaş ve arkadaşlarının Malatya'dan 2005 yılında bildirmiş oldukları 29 ilaç dirençli, 19 Ç D tüberküloz izolatı içeren çalışmada en sık mutasyonlar *rpoB*'nin 531. (%47.6), 526. (%14.3) ve 516. kodonda (%23.8) belirlenmiştir, TCG531TTG Ser531Leu de ikili i görülen major de ikimdir. Çalışmamıza paralel olarak daha düşük oranlarda His526Tyr, His526Asp, His526Arg, Asp516Tyr, Asp516Val, Gln513Pro, Lys527Arg, Ile572Leu aminoasit de ikileri bildirilmiştir (57).

Minh ve arkadaşları Vietnam'ın de ik bölgelerinden toplam 74 RIF dirençli *M. tuberculosis* suşundaki genetik mutasyonları sekans analizi ile araştırmıştır. Yetmi dört RIF dirençli suşta on yedi de ik mutasyon saptanmıştır. Bunların 56'sı (%76) *rpoB* geninin 81-bç "sıcak nokta" adı verilen bölgesinde bulunmuştur. En sık görülen nokta mutasyonlar *rpoB* geninin 531. (%37.8), 526. (%23) ve 516. (%9.46) kodonlarındadır (76). Daha düşük oranlarda 522, 530, 533, 490 ve 531. kodonlarda mutasyon tespit edilmiştir.

Madania ve arkadaşları tarafından 2011 yılında Suriye'den bildirilen çalışmada RIF nedenli mutasyonları karakterize etmek amacıyla, 69 RIF dirençli izolat *rpoB* gen bölgesindeki nokta mutasyonlar açısından DNA dizi analizi ve gerçek zamanlı PZR ile taranmıştır. Altmış dokuz RIF dirençli izolatın, 62'sinde (%)

90) mutasyon saptanmıştır. En sık mutasyonlar, 531. (%61), 526. (%13), ve 516. kodonlarda (% 8,7) tespit edilmiştir. Bu çalışmada iki yeni mutasyon (Asp516Thr ve Ser531Gly) kaydedilmiştir. Sadece bir mutasyon (Ile572Phe) *rpoB* geni dışında belirlenmiştir. Benzer olarak incelediğimiz Ç D su ların %98'inde *rpoB* gen bölgesinin 81 bç'lik sıcak noktasında mutasyon kaydedilmiştir (77).

Tessema ve arkadaşları tarafından 2012'de bildirilen çalışmada Kuzeybatı Etiyopya'dan izole edilen su lar üzerinde INH, RIF ve ETB karşı direnç GenoType® MTBDRplus ve GenoType® MTBDRsl yöntemleri BacT/ALERT 3D sistemi ile karılaştırılmıştır. Mart 2009 ve Temmuz 2009 tarihleri arasında yayma pozitif akciğer tüberkülozlu hastalardan üretilen 260 *M. tuberculosis* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. 161 izolat Ç D tüberküloz olarak tespit edilmiştir. 13 izolat INH, RIF, ETB dirençli su larıdır. On beş RIF dirençli izolattan 12'sinde (%80) *rpoB* gen mutasyonu saptanmıştır. On bir izolatta Ser531Leu'de(%73.3), bir izolatta (%6.6) ise His526Asp'de mutasyon tespit edilmiştir (78).

rpoB gen bölgesindeki mutasyon çalışmalarıyla bulgularımızı karşılaştırmamızda ortaya konulabilecek veriler bunlardır. Çalışmalarda *rpoB* gen bölgesinde %76-98 oranında mutasyon belirlenmiş olup çalışmamızdaki veriler mevcut bulguların üst limitine yakındır. Yayınların ortak bulgusu olarak mutasyonların sıklıkla 531, 526, 516. kodonlarda olduğu görülmektedir. Amino asit değişimi ise en fazla Ser531Leu ekinde kaydedilmektedir.

Mutasyon araştırmasını yaptığımız 52 INH dirençli su ların %86.5'inde *katG* gen bölgesinde mutasyon saptandı. 315. kodonun %84.6'sında 315. kodonda mutasyon kaydedildi. 315. kodondaki mutasyonların tamamında Ser315Thr aminoasidi değişikliği tanımlandı. Bir su larda Gly273Ser aminoasit değişikliği vardı. On beş su larda (%28.8) ise *inhA* promoter gen bölgesinde C(-15)T mutasyonu saptandı. *inhA* promoter gen bölgesindeki on mutasyona *katG* gen bölgesindeki mutasyonlar eşlik ederken, beş su larda tek başına *inhA* promoter gen bölgesi mutasyonu mevcuttu.

Otkun ve arkadaşlarının 2003 yılında Edirne'den bildirdiği çalışmada *katG* genindeki Ser315Thr mutasyonu suşların %56.5'inde (52/92) saptanmıştır. *InhA* genindeki Thr209Met mutasyonu ise %10.9'unda (10/92) tespit edilmiştir (74).

Aktaş ve arkadaşlarının çalışmasında *katG* 315. kodon mutasyonlarının prevalansının (%63.0) önceki yayınlarda bildirilen aralık içinde olmasına karşın, *katG* geninin 315. kodonda mutasyonu olan izolatlar arasında Ç D izolat grubuyla (%78.9), INH mono dirençli izolat grubu (%25) arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Bu bulguyla paralel olarak bizim çalışmamızda incelediğimiz 52 Ç D suşunun (%84.6)'sında 315. kodonda mutasyon saptanmıştır (57).

Minh ve arkadaşları Vietnam'ın değişik bölgelerinden toplam 82 INH dirençli *M. tuberculosis* suşunun genetik mutasyonlarını sekans analizi ile araştırmıştır. INH dirençli olgularında, *katG* geninde beş değişik mutasyon saptanmıştır, bunların arasında kodon 315'teki (%76.83) nükleotid değişikliği en sık görülen mutasyon olmuştur (76). En sık görülen amino asit değişikliği Ser315Thr (%73.1) olarak belirlenmiştir. Daha düşük oranlarda Ser315Asn, Gly309Cys, Lys327Ile değişiklikleri tespit edilmiştir.

Suriye'den Madania ve arkadaşları tarafından 2011 yılında bildirilen çalışmada INH kaynaklı *M. tuberculosis* dirençli nedeniyle mutasyonları karakterize etmek amacıyla, 72 INH dirençli izolat, *katG* ve *inhA* gen bölgelerindeki nokta mutasyonları DNA dizi analizi ve gerçek zamanlı PZR ile taranmıştır. Yetmiş iki INH dirençli suşunun, 30'ü *katG* kodon 315'de (41.6%) ve 23'ü (% 32) *inhA* C(-15)T gen bölgesinde mutasyon barındırmıştır (77).

Tessema ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 35 INH dirençli suşunun 33'ünün (%94.2) Ser315Thr *katG* geninde mutasyon saptanmıştır ve iki suşta C15T de *inhA* geninde mutasyon bulunmuştur (78).

Bulgularımız ve yapılan çalışmalardan INH dirençli suşlarda *katG* gen bölgesindeki mutasyon oranının %41-94 oranında değiştiği ve suşların %10-32'sinde *inhA* gen bölgesinde değişimin olduğu anlaşılmaktadır.

Çalı mamızda 52 Ç D *M. tuberculosis* su arasında 15 farklı spoligotip saptanmı olup bunlardan 11 tanesi küme olu turan su ları bulundurmaktadır. Kümeleme oranı %92.3 gibi oldukça yüksek oranda saptanmı tır. MIRU-VNTR yönteminin yüksek ayırım gücü ara tırmamızda da gözlemlenmi tir. Spoligotiplendirmede %92.3'ü küme içinde yer alan su ların, MIRU-VNTR yönteminde yalnızca %11.5'i küme olu turmu tur. Bu bulgular çapraz bulma ı ortaya koymak açısından spoligotiplendirmenin yetersiz oldu unu IS6110 veya MIRU-VNTR gibi ayırım gücü yüksek tiplendirme yöntemlerine gerek oldu unu göstermektedir. 52 *M. tuberculosis* su unda 13 farklı SIT saptandı. Üç su özgü olup, SpolDB4 veri bankasından herhangi bir SIT numarasıyla e lemedi. Çalı maya dahil edilen 52 *M. tuberculosis* izolatından 21'inin T (%40.3) ailesinden, 14'ünün (%26.9) LAM ailesinden, 4'ünün H (%7.6) ailesinden üçer su un (%5.7) X, S ailelerinden, iki er tanesinin (%3.8) Beijing ve U ailelerinden, olu tu u görüldü. Üç su (%5.7) özgü profil sergilemi tir.

Otkun ve arkadaş larının 2003 yılında Edirne'den bildirdi i çalı mada dirençli 92 izolatın 81'ine IS6110 tiplendirme yöntemi uygulanmı tır. Bu izolatlardan elli ikisi be ten fazla banda sahip olup, yüksek kopya sayılı izolatlar olarak kaydedilmemi tir. IS6110 tiplendirmesi sonucunda 59 farklı patern belirlenmi ve su ların 49'u özgü profil sergilemi tir. En büyük iki küme altı ve be izolat içermi , izolat başına IS6110 kopya sayısı 1-17 olarak belirlenmi tir. Bu izolatların % 35.8'i (29/81) düşük kopya sayısına sahip oldu u saptanmı tır. IS6110 yöntemi sonucunda düşük kopya sayılı bulunan izolatları tiplendirebilmek için spoligotiplendirme yöntemi çalı ılmı tır. Spoligotiplendirme yöntemine göre 92 izolat 41 farklı patern göstermekle beraber bunların 29'u tek izolata ait paternlerdir. Saptanan 12 kümenin içerdi i izolat sayısı 2 ile 17 arasında farklılık göstermektedir. SpoIDB3 veri tabanına göre en büyük küme 17 izolat içermektedir ve T1 ailesine dahildir. İkinci en büyük küme 15 izolat içermekte olup LAM 7 ailesinin mensubudur. Haarlem 3 grubunda 5 izolat saptanmı tır. Beijing, X, EAI (East-African Indian), CAS (Central-Middle Eastern Asia), S ailelerinden izolat saptanmamı tır (74).

Durmaz ve arkadaş ları tarafından 2007 yılında bildirilen çalı mada, Türkiye'nin dört de i ik bölgesinden toplam 200 adet ilaca dirençli su un (Marmara n=81, Akdeniz n_39, Ege n=42, Do u Anadolu n=38) spoligotiplendirme ve IS6110

RFLP ile tiplmeleri yapılmı tır. Spoligotiplendirme ile tanımlanan ST'ler ve kar ılık gelen familyaları ST41 (%22.5, LAM7-TUR), ST53 (%19.5, geçici olarak tanımlanmı T süperfamilyası), ST50 (%6.5, Haarlem 3), ST1261 (%4.5, LAM7-TUR), ST 47 (%3.5, Haarlem 1), ST284, (%3) ve ST2067, (%2.5) olarak bulunmu tur. laca dirençli su lar arasında *M. tuberculosis* gruplarının global da ılımı: T süper ailesi (%29), Latin Amerikan ve Akdeniz (%33.5), Haarlem (%14%) ve S (%3) eklindedir. Çok sayıda su ta (n=29, %14.5), bugüne kadar tanımlanmı ana nesillerden birine ait olmayan özellikler bildirilmı tir. Spoligotiplendirme ve IS6110-RFLP parmak izi yöntemlerinin kombinasyonuyla sonuçta %38.5'luk kümelenme kaydedilmı tir (79).

Çavu o lu ve arkadaş ları tarafından 2007 yılında bildirilen çalı mada Ege Bölgesi'nde 26 farklı hastadan izole edilen ve IS6110-RFLP paternleri bilinen 26 RIF dirençli *M. tuberculosis* su u MIRU-VNTR yöntemiyle tiplendirilmı , çıkan sonuçlar IS6110 RFLP sonuçları ile kar ıla tırılmı tır. Bu çalı mada, izolatların ço unda MIRU VNTR yöntemiyle olu an kümelerin IS6110 RFLP yöntemiyle olu an kümelerle uyumlu oldu u belirlenmi ve sırasıyla MIRU 16, MIRU 40, MIRU 26, MIRU 10, MIRU 04 ve MIRU 31'in allelik farklılı ı ve ayırım gücü en yüksek lokuslar oldu u tespit edilmı tir. Klasik 12 MIRU-VNTR lokusunun allelik farklılıklarından kaynaklanan ayırım güçleri arasında de i iklikler oldu u ve ayırım gücü yüksek olarak bulunan yukarıdaki lokuslara ilave olarak allelik ayırım gücü yüksek di er bazı lokusların da kullanılmasıyla, bu yöntemin epidemiyolojik çalı malarda uygulanabilir bir yöntem olabilece i ortaya konulmu tur (6). Çalı mamızda moleküler epidemiyolojik tiplendirme amacıyla 24 lokuslu MIRU-VNTR kullanıldı ve kümeleme oranı (%11.5) olarak saptandı. Bu yöntem tüberkülozun moleküler tiplendirmesinde referans olarak geli tirilmı ve ayırım gücü en yüksek olan sistemdir (80).

Zeytinli ve arkadaş larının yaptı ı çalı mada, Ocak 2007-Haziran 2010 tarihlerinde Çukurova bölgesindeki 17 Verem Sava Dispanseri, bir gö üs hastalıkları hastanesi ve iki devlet hastanesinden, Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarı'na gönderilen, akci er tüberkülozlu hastalara ait örneklerden üretilen 467 su incelemeye alınmı tır. zolatların tamamına spoligotiplendirme ve 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi çalı ılmı tır. Spoligotiplendirme yöntemiyle 467 izolatın

443'ünün (%94.3) 21 küme içerisinde bulundu u, 24'ünün (%5.1) ise SpolDB4 veri bankasındaki hiçbir küme içinde yer almadı ı ortaya konulmu tur. Bölgede en yaygın görülen ailenin T1 ailesi oldu u (%51.9), bunu LAM7 TUR ailesinin (%11.5) izledi i, sadece anlıurfa ilinden izole edilen su lardan altısının (%1.3) Beijing ailesine ait Ç D izolatlar oldu u saptanmı tur. Spoligotiplendirme yöntemine göre en fazla üyeye sahip olan T1 ailesinden 239 su , 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi kombinasyonuyla, üye sayıları 2-158 arasında farklılık sergileyen yedi alt kümeye ayrılmı , 21 izolat ise özgü karakter göstermi tir. Spoligotiplendirme yöntemiyle de erlendirilen su lar arasında, bölgede T1 ailesinin daha baskın oldu u tespit edilmi tir. *M. tuberculosis* Beijing su u prevalansı %1.3 olarak belirlenmi tir (66).

2005 yılında Zozio ve arkadaşları tarafından bildirilen çalı mada, Malatya'dan çalı maya alınan 147 *M. tuberculosis* su u ile Ankara'dan toplanan 98 su un spoligotipleme profilleri çıkarılmı tur. Toplam 71 spoligotipi saptanmı olup 33 tanesi kümeleme mi , 39'u ise özgü profil sergilemi tir. Spoligotiplendirme yöntemine göre 206 su küme içinde yer almı ve kümeleme oranı %84.1 bulunmu tur. Malatya'daki su ların %58'den ve Ankara'dakilerin %38'den fazlası ST41 (LAM7-TUR, %21),ST53, ST50 ve ST284 olarak adlandırılan dört tipten olu mu tur. Malatya'dan çalı maya alınan 147 su ayrı de erlendirildi inde; spoligotipleme 27 özgü, 19 grup (toplam 120 su) halinde olan toplam 46 spoligotipi kaydedilmi tir. Malatya'dan çalı maya alınan su ların %80.2'si grup içinde yer almı tur. Grupların gen li i 2-33 su arasında farklılık göstermi tir. Major *M. tuberculosis* familyalarına göre su ların dağılımı ise sırayla: geçici olarak tanımlanmı T süperfamilyası (%45.7), Latin Amerika-Akdeniz (%29), Haarlem (%15.9) olarak tespit edilmi tir. Malatya'daki su lardan Beijing, EAI (East-African Indian), CAS (Central-Middle Eastern Asia), Africanum ailelerinden izolat bulunamamı tur (62).

Kısa ve arkadaşları tarafından Ankara'dan 2012 yılında bildirilen çalı mada üç farklı merkezden toplanan 73 INH (% 76.8), 45 RIF (% 47.4), 32 SM (% 33.7), 31 ETB (32.6%) dirençli toplam 95 ilaca dirençli *M. tuberculosis* izolatı incelemeye alınmı tur. Dört ana antitüberküloz ilaçlarına izolatların duyarlılık testi LJ besiyeri ortamı ve BACTEC 460 TB sistemi oran yöntemi kullanılarak yapılmı tur. Tüm klinik izolatlar spoligotiplendirme ve IS6110 RFLP yöntemleri kullanılarak analiz

edilmi tir. Spoligotiplendirme kullanarak, 35 farklı patern gözlenmi tir. Yetmi be klinik izolat 15 küme halinde gruplandırılmı (% 79 kümeleme oranı) ve 20 izolat özgü profil sergilemi tir. En yaygın *M. tuberculosis* familyaları Haarlem (%24.2), T süperfamilya (%23.2), Türkiye familyası (%20), Beijing (%6.3), Latin Amerika-Akdeniz (%5.3), Manu (%3.2) ve S (%1) soyları olarak saptanmı tir. Altı Beijing familyasından dördü (%66.7) Ç D su larında gözlemlenmi tir. Ç D izolatlarında IS6110 RFLP ve spoligotiplendirme kombinasyonu arasında kümeleme oranını % 79'dan %11,5'e düşürdü (81).

Çavunlu ve arkadaşlarının 2004'te Ege bölgesinden bildirdiği çalışmada 26 hastanın balgam örneklerinden üretilen *M. tuberculosis* su larının tiplendirmesi için IS6110 ve pTBN12 RFLP yöntemleri kullanılmı tir. Su ların 23'ü Ç D üç tanesi yalnızca RIF dirençli olarak tanımlanmı tir. Yirmi altı RIF dirençli izolatta 18'den fazla IS6110 DNA parmak izi gözlenmi tir. Bu yöntem birlikte değerlendirildiğinde, kümeleme düzeyi %34.6 olarak bildirilmı tir. IS6110 parmak izleri Ege bölgesinden toplanan RIF dirençli izolatların göreceli olarak yüksek kümeleme oranı olduğunu ve klonal olarak ilintili olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular RIF dirençli izolatların hastalar arasında aktif olarak bulaştığını göstermektedir (82).

Ülkemizde farklı merkezlerden bildirilen bulgular çalışmamızla karıştırdığında sıkça saptanan SIT'ler ve major spoligofamilyalar açısından benzerlikler vardır. Ayrıca yapılan araştırmalardan spoligotiplendirme sonucunda saptanmı olan yüksek kümeleme oranının gerçek çapraz bulaşı ortaya koymada yetersiz olduğunu, verilerin ayırım gücü daha yüksek olan MIRU-VNTR veya IS6110 RFLP ile doğrulanması gerektiği ortaya çıkmaktadır. *M. tuberculosis* su ları arasındaki çapraz bulaşı araştırmadan ziyade, filogenetik çalışmalarda öne çıkan spoligotiplendirme verilerine göre ülkemizde heterojen tüberküloz basil popülasyonu vardır. Bir taraftan tüm dünyada yaygın olarak gözlenen SIT53, yalnızca ülkemiz ve komşularımızda gözlenen SIT41 bulunurken su ların %5'den fazlası dünya veri bankasında bulunmayan özgü profiller sergilemektedir. MIRU-VNTR sonuçları ülkemizde Ç D tüberküloz su ları arasında gözlenen çapraz bulaşın (%11), kontrol edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir.

SONUÇ ve ÖNER LER

Türkiye'nin farklı bölgelerinden 52 Ç D *M. tuberculosis* su larının mutasyon analizi ve moleküler tiplendirme yöntemlerinden elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

1.Ç D su ların %98'inde *rpoB* gen bölgesinde mutasyon saptanmış olup, saptanan major mutasyonlar 531, 526, 516. kodonlardadır.

2.Ç D su ların %86.5'inde *katG* geninde, %28.8'inde *inhA* promoter gen bölgesinde mutasyon saptandı. *katG* geninde en sık görülen aminoasit değişikliği Ser315Thr değişikliği olarak belirlendi.

3.Spoligotiplendirme sonucunda dirençli su larda sıklıkla SIT 53 (%28.8), SIT 1261 (%13.4) ve SIT 41 (%11.5) saptandı.

4.Spoligotiplerden, Dünya veri bankasındaki hiçbir veri ile örtüşmeyen özgü profil sayısı üçtür.

5.Birçok ülkede yaygın olarak gözlenen Beijing genotipi iki su ta saptandı.

6.MIRU-VNTR yöntemiyle incelenen su lar arasında çapraz bulaş oranının %11.5 olduğu görüldü.

7. MIRU-VNTR sonuçları, ülkemizdeki Ç D tüberküloz su ları arasında gözlenen çapraz bulaşın kontrol edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Baylan O. Çok ilaca Dirençli Tüberkülozdan Sonra Yaygın ilaca Dirençli ve Tüm ilaçlara Dirençli Tüberküloz Formları: Eski Hastalığın Yeni Yüzleri. Mikrobiyol Bul. 2011; 45(1): 181-195.
- 2- http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ Erişim tarihi: 25.10.2013.
- 3- Musaonbaşıoğlu S, Yıldırım A, Mutlu M, Baykal F. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı Türkiye’de Verem Savaşı 2012 Raporu. Ed. Buzgan T, Torunoğlu MA, Ankara, Anıl Matbaacılık, 2012.
- 4- Özkara , Akta Z, Özkan S, Ecevit H. T.C.Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü için Basmavuru Kitabı. Ankara, 2003.
- 5- Esen N, Özkütük A, Çoban H, Atlas E. Rutin Mikobakteriyoloji Laboratuvarları için Üç Adımda Mıru-Vnr, Mikrobiyol Bul. 2010; 44: 375-383.
- 6- Çavuşoğlu C, Karata E, Söylenir . Rifampisine Dirençli izolatların Mıru-Vnr (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeat) Yöntemiyle Genotiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2007; 41: 385-393.
- 7- Gopaul KK, Brown TJ, Gibson AL, Yates MD, Drobniewski FA. Progression to ward an improved DNA amplification-based typing technique in the study of *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology. J. Clin Microbiol. 2006; 44:2492-8.
- 8- Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin. Microbiol Rev. 2006; 19(4): 658-85.
- 9- Durmaz R. Tüberkülozda Hızlı Moleküler Tanı Testleri. Ankem Derg. 2012; 26:72-81.
- 10- Barı Y. Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. Türk Toraks Derg. 2002; 3(3): 338-340.
- 11- Köksal F. Tüberküloz Basilinin Kaynak ve Evrimi. Tüberküloz Sempozyum Kitapçığı. Malatya, 2003; 34-47.
- 12- Barı Y. Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. Tüberküloz, 11. Sayı, Ed. Özkara , Kılıçaslan Z, İstanbul, Aves Yayıncılık, 2010; 1-16.
- 13- Karlıkaya C. Tüberküloz.
<http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/tbdernot.htm>. Erişim tarihi: 01.10.2013
- 14- Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. Eur Respir J. 2002; 20 (36): 87-94.

- 15- Medical Research Council. Various combinations of isoniazid with streptomycin or with PAS in the treatment of pulmonary tuberculosis. *BMJ* 1955; 1: 435-445.
- 16- Çavuşoğlu C. *M.tuberculosis* Genomu Ve Genetik özellikleri. *Tüberküloz*, 11. Sayı, Ed. Özkara , Kılıçaslan Z, İstanbul, Aves Yayıncılık, 2010; 52-61.
- 17- Köksal F. *Tüberküloz Basilinin Kaynağı Ve Evrimi*.
<http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/982011113538-1.pdf>. Erişim tarihi: 01.10.2013
- 18- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(6):3684-9.
- 19- Türkkani MH, Musaonbaşıoğlu S, Yıldırım A, Baykal F. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı. Türkiye’de Verem Savaşı 2011 Raporu. Ed. Bozkurt H, Ankara, Fersa Ofset, 2011.
- 20- Kıyan M. *Mycobacteriaceae*. Temel Ve Klinik Mikrobiyoloji, Ed. Ustaçelebi , Ankara, Öncü Basımevi, 1999; 419-455.
- 21- Alp A. *Tüberküloz Basili ve Özellikleri*. *Tüberküloz*, 11. Sayı, Ed. Özkara , Kılıçaslan Z, İstanbul, Aves Yayıncılık 2010; 48-51.
- 22- Hall GS, Howard BJ. *Mycobacteria*. Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC, Eds. *Clinical and Pathogenic Microbiology* Sekond edition. St. Louis.1994; 503-529.
- 23- Köksal F, Yaman A. Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı. 21.Yüzyılda *Tüberküloz Sempozyumu*. Samsun, 2003; 34-47.
- 24- Gedikoğlu S. *M.tuberculosis’in* Hücre Yapısı. *İnfeksiyon Derg.* 1997;11:13-18.
- 25- Kocabaş A. Günümüzde *Tüberküloz Sorunu*. *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*, Ed. Kocabaş A, Adana, Çukurova Üniversitesi Basımevi, 1991; 3-32.
- 26- Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003; 83(1-3):91-7.
- 27- Pfyffer GE, Brown BA, Swenson JM, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium*. General Characteristics, Isolation and Staining Procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC (Eds) *Manuel of Clinical Microbiology* 8th edition, ASM Press, Washington DC, 2003.
- 28- Schwander SK, Torres M, Seda E, et al. Enhanced responses to *M. tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 1998; 178: 1434-45.

- 29- Esen N. Tüberkülozda Mikobakteriyel Persistans Mekanizmaları.
<http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/982011114546-6.pdf>.
Erişim tarihi: 04.10.2013
- 30- Eyübo lu FÖ. Tüberküloz Patogenezi. Tüberküloz 11. Sayı, Ed. Özkara , Kılıçaslan Z, İstanbul, Aves Yayıncılık, 2010; 66-70.
- 31- Raja A. Immunology of tuberculosis. Indian J Med Res. 2004; 120: 213-232.
- 32- Özbal Y. Tüberküloz immünolojisi. Erciyes Tıp Derg. 2006; 28 (1): 25-34.
- 33- Otkun M. Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu. Klimik Derg. 2001; 14(2): 71-82.
- 34- Wallace RJ. Antimycobacterial agents. In: Mandell G, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2000: 436-448.
- 35- Kocaba A. Akciğer tüberkülozu. Enfeksiyon Hastalıkları, Ed. Topçu Willke A, Söyletir G, Doğanay M, İstanbul, 1. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 1996; 396-443.
- 36- Durmaz R, Ozerol IH, Durmaz B, Gunal S, Senoglu A, Evliyaoglu E. Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. Microb Drug Resist. 2003; 9(4):361-6.
- 37- World Health Organization: Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Third Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1999-2002,WHO (2005).
- 38- Saniç A. Tüberküloz Direnç Mekanizmaları. 5.Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Kitapçığı. İzmir, 2004; 24-35.
- 39- Oguz Kayaalp. Tüberküloz ve Diğer Mikobakteri Enfeksiyonlarında Kullanılan İlaçlar. In: Tıbbi Farmakoloji. 2002: 306-312.
- 40- Douglas JG, McLeod MJ. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. Clin Pharmacokinet 1999; 37(2): 127-146.
- 41- Nusrath Unissa A, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR. Molecular analysis of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. Int J Antimicrob Agents. 2008; 31(1): 71-5.
- 42- Silva PA, Ainsa JA. Drugs and drug interactions, In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (eds), Tuberculosis 2007, from Basic Science to Patients Care. 2007; 593-633.

- 43- Artvinli M. Tüberküloz ilaçları Ve Yan Etkileri. Tüberküloz Klinigi Ve Kontrolü, Ed. Kocabas A. 1. Baskı 1991; 265-271.
- 44- Bardarov S Jr, Dou H, Eisenach K et al. Detection and drug-susceptibility testing of *M. tuberculosis* from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system. *Curr Opin Pulm Med.* 2006;12(3):172-8.
- 45- Douglas J, Steyn L. A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis.* 1993;167:1505-6.
- 46- Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis*' te Direnç Sorunu. *Ankem Derg.* 2005; 19(2): 107-110.
- 47- Martin A, Portaels F. Drug resistance and drug resistance detection. Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (eds), *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care.* 2007; 635-87.
- 48- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (eds): *Mycobacteria.* Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St. Louis, Mosby, 2007; 478-510.
- 49- Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye' de Tüberküloz Epidemiyolojisi ve Kontrolü. Güncel Bilgiler I 1 ında nfeksiyon Hastalıkları II, Ed. Uzun Ö, Ünal S, 1. Baskı, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002; 821-903.
- 50- Esen N. Tüberküloz ilaç Duyarlılık Testi Ve DT' de Kalite Kontrolü. Tüberküloz, 11. Sayı, Ed. Özkara , Kılıçaslan Z, stanbul, Aves Yayıncılık, 2010; 110-117.
- 51- Durmaz R. *Mycobacterium Tuberculosis* Su larında Direncin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemler/ Son Geli meler. *Ankem Derg.* 2010; 24(Ek 2): 64-70.
- 52- Esen N. Mikobakterilerin Tanısında, Tanımlanmasında Ve ilaç Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. *nfeksiyon Derg.* 2003; 17(4): 507-511.
- 53- Palomino JC. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2006;12(3):172-8.
- 54- Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Allele-specific *rpoB* PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(7):2231-5.
- 55- Williams DL, Limbers CW, Spring L, Jayachandra S, Gillis T. PCR-heteroduplex detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Persing DH (eds), *PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases.* 1996; 122-9.
- 56- Garcia De Viedma D, del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E. New real-time PCR able to detection in a single tube multiple rifampin

resistance mutations and high level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002;40:988-95.

57- Aktas E, Durmaz R, Yang D, Yang Z. Molecular characterization of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Malatya, Turkey. Microb Drug Resist. 2005;11(2):94-9.

58- Çavuşoğlu C. Baz Dizi Analizi Teknolojisi: Teknik Prensipleri Ve Bakteriyolojide Kullanımı. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı, Ed. Durmaz R, Malatya, 2007; 94-98.

59- van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2578-86.

60- Cronin WA, Golub JE, Lathan MJ et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in a low- to moderate-incidence state: Are contact investigations enough? Emerg Infect Dis. 2002; 8:1271-9.

61- Achonu C, Jamieson F, Behr MA, Lillebaek T, Khan K, Gardam M. Evidence for local transmission and reactivation of tuberculosis in the Toronto Somali community. Scand. J. Infect. Dis. 2006; 38:778-81.

62- Zozio T, Allix C, Günel S et al. 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 Microbiol. 2005; 5:44.

63- Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis* Su larının Genotiplendirilmesi: IS6110 ve pTBN12-Fingerprinting. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kitabı, Ed. Durmaz R, İstanbul, Nobel Kitabevleri Ltd, 2001; 181-190.

64- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993; 31: 406-9.

65- Durmaz R, Günel S, Çavuşoğlu C. *Mycobacterium Tuberculosis* Su larının Moleküler Epidemiyolojisinde Kullanılan Yöntemler: IS6110 Fingerprinting, Spoligotyping Ve MIRU-VNTR. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kitabı, Ed. Durmaz R, Malatya, Nobel Kitabevleri Ltd, 2007; 214-233.

66- Zeytinli ÜO, Köksal F. Çukurova Bölgesinden Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzlenen *Mycobacterium Tuberculosis* Su larının Spoligotiplendirme ve Miru-Vntr yöntemiyle tiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2012; 46, 202-210.

67- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997;35(4):907-14.

- 68- Sürücüo lu S. Tüberküloz Epidemiyolojisinde Moleküler Yöntemler. Tüberküloz, 11. Sayı, Ed. Özkara , Kılıçaslan Z, stanbul, Aves Yayıncılık, 2010; 149-160.
- 69- Ceyahan , Saygan BM, Saniç A, Tarhan G. İaç Duyarlılık Testlerinde Proporsiyon Yöntemi. Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı. Ankara, 2007; 67-78.
- 70- Çavuo lu C. Mikobakterilerin Tanımlanması Ve İaç Direncinin Saptanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kitabı, Ed. Durmaz R, Malatya, Nobel Kitabevleri Ltd, 2007; 273-287.
- 71- Ramirez MV, Cowart KC, Campbell PJ, Morlock GP, Sikes D, Winchell JM, Posey JE. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. J Clin Microbiol. 2010; 48(11): 4003-9.
- 72- Ballif M, Harino P, Ley S, Coscolla M, Niemann S, Carter R, Coulter C, Borrell S, Siba P, Phuanukoonnon S, Gagneux S, Beck HP. Drug resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* from Madang, Papua New Guinea. BMC Microbiol. 2012;12:191.
- 73- Manual of multilocus variable numbers of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. RIVM , National Institute for Public Health and the Environment, The Netherlands.
<http://www.tuberculosis.rivm.nl/documents/ECDC/Protocol>
- 74- Otkun M, Tansel Ö, Akata F, Otkun MT. Ço ul Dirençli *Mycobacterium Tuberculosis* zolatlarında Sekonder İaçlara Direnç ve Epidemiyolojik takip. Proje no: SBAH-2334. 2013; Edirne.
- 75- Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. J Clin Microbiol. 2002; 40(12):4435-8.
- 76- Minh NN, Van Bac N, Son NT, Lien VT, Ha CH, Cuong NH, Mai CT, Le TH. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Vietnam. J Clin Microbiol. 2012; 50(3):598-601.
- 77- Madania A, Habous M, Zarzour H, Ghoury I, Hebbo B. Characterization of mutations causing rifampicin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Syria. Pol J Microbiol. 2012;61(1):23-32.
- 78- Tessema B, Beer J, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC. Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia. BMC Infect Dis. 2012; 12:37.
- 79- Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Yaman A, Cavusoglu C, Guney C, Sola C, Rastogi N. Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant *Mycobacterium*

tuberculosis clinical isolates from different regions of Turkey. Infect Genet Evol. 2007;7(4):513-9.

80- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006; 44(12): 4498-510.

81- Kisa O, Tarhan G, Gunal S, Albay A, Durmaz R, Saribas Z, Zozio T, Alp A, Ceyhan I, Tombak A, Rastogi N. Distribution of spoligotyping defined genotypic lineages among drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates in Ankara, Turkey. Plos One. 2012; 7(1).

82- Cavusoglu C, Durmaz R, Bilgic A, Gunal S. Genotyping of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from western Turkey. Ann Saudi Med. 2004 ;24(2):102-5.