

**ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX SUŞLARININ
SPOLİGOTİPLENDİRME VE MIRU-VNTR YÖNTEMLERİYLE
MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

BURCU GÜRER GİRAY

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
OCAK-2020**

**ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX SUŞLARININ
SPOLİGOTİPLENDİRME VE MIRU-VNTR YÖNTEMLERİYLE
MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

BURCU GÜRER GİRAY

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**


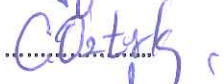

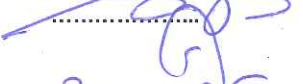

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. GÖNÜL ASLAN**

**MERSİN
OCAK-2020**

ONAY

Burcu GÜNER GİRAY tarafından Prof. Dr. Gönül ASLAN danışmanlığında “ Çoklu ilaç dirençli (ÇİD) Mycobacterium tuberculosis kompleks suşlarının spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile moleküler tiplendirilmesi” başlıklı bu çalışmada aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 08/Ocak/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Gönül ASLAN	
Üye	Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK	
Üye	Prof. Dr. M. Sami SERİN	
Üye	Prof. Dr. Ayşen BAYRAM	
Üye	Prof. Dr. Burçin ÖZER	

Yukarıdaki jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 09.01.2020 tarih ve 2020-01/22 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

08/Ocak/ 2020 / January 8, 2020

İmza / Signature



Burcu GÜRER GİRAY

ÖZET

ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX* SUŞLARININ SPOLİGOTİPLENDİRME ve MIRU-VNTR YÖNTEMLERİYLE MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

Günümüzde refah seviyesi yüksek ülkelere kontrolsüz göç hareketlerinin yaşanmasıyla birlikte *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC)'in kıtalar arası yayılma eğilimi göstermesi, TB'nin küresel bir sağlık sorunu olduğunu göstermektedir. Bu küresel sorun MTBC suşlarının, coğrafya üzerinde yayılımının klonal düzeyde yüksek ayırım gücüne sahip moleküler epidemiyolojik yöntemlerle izlenmesi ile elde edilecek verilerin kullanılmasına bağlı olarak aşılabilir. Özellikle riskli bölgelerde tüberküloz epidemiyolojisi ile ilgili spoligotiplendirme ve 15 lokus Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)-Variable Number Tandem Repeats (VNTR) yöntemleri gibi moleküler bazlı yöntemlerin kullanıldığı birçok araştırma yapılmasına rağmen, ülkemizde MTBC'in epidemiyolojik özelliklerini tespitine yönelik çalışma sayısı yetersizdir. Bu çalışmada spoligotiplendirme ve 15 lokus MIRU-VNTR moleküler yöntemleriyle klonal düzeyde MTBC suşları tür düzeyinde tayin edilerek filogenetik ilişkilerinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya Haziran 2018-Mayıs 2019 tarihleri arasında Ankara Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'na, Tüberküloz Laboratuvar Sürveyans Ağı'na üye olan merkezlerden ve çeşitli yataklı hastanelerden gönderilen akciğer tüberküloz ön tanılı veya şüpheli temas öyküsü olan hasta balgam örneklerinden izole edilen 96 ÇİD-MTBC suşu dahil edilmiştir. Suşlar klonal düzeyde tanı amacı ile spoligotiplendirme ve 15 lokus MIRU-VTR yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

Spoligotiplendirme yöntemi ile 96 ÇİD-MTBC izolatı içerisinde 93 izolatın (%96.88) 14 majör spoligofamilya (klad) kümesi içerisinde yoğunlaştığı, 2 izolatın (%2.08) ise SITVIT2 veri tabanındaki suşlarla karşılaştırma sonucunda bilinen hiçbir klad altında sınıflandırılmadığı, 1 izolatın (%1.04) yine SITVIT2 veri tabanındaki suşlarla karşılaştırma sonucunda atipik olarak değerlendirildiği görülmüştür. En yaygın olan kladın 38 (%40.86) izolat ile T1 kümesi olduğu, bunu 16 (%17.20) izolat ile Beijing kladı, 9 (%9.67) izolat ile LAM 9 ve 8 (%8.60) izolat ile LAM7 TUR kladının izlediği görüldü. Bu çalışma sonunda ülkemiz genelinde T1 kladının daha yaygın olduğu görülmüştür. Yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak LAM7-TUR kladı Beijing kladının görülme oranının gerisinde kalmıştır. 15 lokus MIRU-VNTR ile yaptığımız klonal tiplerede aynı kladlarda kümelenen suşların farklı lokus profiline sahip olduğunu, yani aynı klondan bulaşın olmadığını bulduk.

Anahtar Kelimeler: MTBC, Spoligotiplendirme, MIRU-VNTR, ÇİD-TB

Danışman: Prof. Dr. Gönül ASLAN, Mersin Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

MOLECULAR TYPING OF MULTIPLE DRUG RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX STRUCTURES BY SPOLIGOTYPING AND MIRU-VNTR METHODS

The fact that MDR strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) tends to spread across the continents with uncontrolled migration movements to high-welfare countries shows that TB is a global health problem. This global problem can be surpassed by using data to be obtained through monitoring the circulation of MTBC strains on geography by molecular epidemiological methods with high discriminatory power in clonal level. Although spoligotyping related to epidemiology of tuberculosis and molecular based methods such as 15 locus *Mycobacterium* Interspersed Repetitive Unit (MIRU)-Variable Number Tandem Repeats (VNTR) methods have been used especially in risky regions, number of studies on determining the epidemiological properties of MTBC is insufficient in our country. In this study, it was aimed to investigate the phylogenetic relationships by determining the MTBC strains at the species level in clonal level by spoligotyping and 15 loci MIRU-VNTR molecular methods.

The study included 96 MDR-MTBC strains isolated from sputum samples of patients with pre-diagnosed or suspected contact history of pulmonary tuberculosis those sent from centers and several hospitals that are members of Tuberculosis Laboratory Surveillance Network to Ankara National Tuberculosis Reference Laboratory between June 2018 and May 2019. Strains were evaluated by spoligotyping and 15 loci MIRU-VTR methods for diagnosis at clonal level.

Spoligotyping method revealed that 93 (96.88%) of 96 isolates were concentrated in 14 major spoligofamily (clad) clusters, 2 isolates (2.08%) were found to be classified under no known clads as a result of comparison with strains in SITVIT2 database and 1 isolate (1.04%) was found to be atypical in comparison with the SITVIT2 database. The most common cladding was T1 cluster with 38 (40.86%) isolates, followed by Beijing with 16 (17.20%) isolates, LAM 9 with 9 (9.67%) isolates and LAM7 TUR with 8 (8.60%) isolates. As a result of study, it was found that T1 cladding is more common in our country. Unlike other studies, the LAM7-TUR cladding lags behind Beijing clad incidence rate. In our clonal typing with 15 loci MIRU-VNTR, we found that none of the strains had the same locus profile so they did not belong to the same clone.

Keywords: MTBC, Spoligotyping, MIRU-VNTR, MDR-TB

Advisor: Prof. Dr. Gönül ASLAN, Department of Medical Microbiology, University of Mersin, Turkey

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora eğitim/öğrenim hayatıma adım attığım andan itibaren mesleki yetenek ve bilgi birikimine hayran olduğum, her şeyden önce insani değerleriyle yol kat edebilmemize sonsuz emek harcayarak ışık tutan ve hayat yolumda önder olarak izlediğim bir bilim insanı olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez hocam Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN'a minnet ve teşekkür duygularımı iletmeyi bir borç bilirim.

Lisansüstü eğitimim boyunca karşılaştığım her zorluğu çözmeyi ve bilgiyi keşfetmeyi kendisinin yol göstericiliği ile öğrendiğim Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a sonsuz saygıyla teşekkür ederim.

Bu tezin yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım bölümümüzdeki değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU, Sayın Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER'e ve Anabilim Dalından emekli olan Sayın Prof. Dr. Feza OTAĞ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım ve doktora süresince yoluma hep ışık tutan ve sonsuz desteklerini gördüğüm Sayın Prof. Dr. M. Sami SERİN ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mahmut ÜLGER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve her konuda bana destek olan Sayın Prof. Dr. Selçuk KILIÇ'a, Sayın Uzm. Dr. Ahmet ASLANTÜRK'e ve Sayın Uzm. Biyolog Hamit ÖZSARAÇ'a teşekkür ederim.

Doktora süresince desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Gülay KORUKLUOĞLU'na ve Sayın Uzm. Dr. Yasemin COŞGUN'a teşekkür ederim.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm çalışma arkadaşlarıma, yaşamın bana gülümseyişler olarak sunduğu yerleri doldurulamaz dostlarıma teşekkür ederim.

Yola birlikte çıktığımız için kendimi çok şanslı hissettiğim değerli dostlarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Didem ÖZGÜR'e, Sayın Arş. Gör. Efdal OKTAY GÜLTEKİN'e ve Sayın Uzm. Biyolog Harun GÜLBUDAK'a teşekkür ederim.

Hayatın benim için mükemmel olması adına olmazları oldurtan annem ve babama, onun gibi bir kız kardeşe sahip olmanın ömür çizgimin bana lütfettiği bir şans olan ablama ve hayatın ne kadar eşsiz olduğunu varlığıyla bana yaşatan eşim Sait Murat GİRAY'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması MEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2019-1-TP3-3148 numaralı BAP projesi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Mikobakterilerin Özellikleri	7
2.2.1. Mikobakterilerin Hücre Yapısı	8
2.3. Mikobakterilerin Sınıflandırılması	9
2.3.1. Mycobacterium tuberculosis complex	11
2.4. MTBC Soyları	17
2.5. Virülans	19
2.5.1. Mikobakteriyal Proteinler	19
2.5.2. Mikobakteriyal Lipidler	20
2.5.3. Mikobakteriyel Enzimler	21
2.5.4. Transkript Regülatörleri	21
2.6. Bulaş Yolu ve İmmünopatogenez	21
2.6.1. Doğal İmmün Cevap	22
2.6.2. Kazanılmış İmmün Cevap	24
2.6.2.1 Hümorale İmmün Cevap	24
2.6.2.2 Hücresel İmmün Cevap	24
2.7. Klinik Tablo	25
2.7.1 Tüberküloz Olgu Tanımları	27
2.8. Tanı	28
2.8.1. Dolaylı Tanı	28
2.8.2. Doğrudan Tanı	28
2.9. Tüberküloz Tedavisi	33
2.9.1. Antimikrobiyal İlaçlar	33
2.9.1.1. Birinci Seçenek İlaçlar	34
2.9.1.2. İkinci Seçenek İlaçlar	36
2.9.2. Antimikrobiyal İlaç Direnci	38
2.10. Epidemiyoloji	40
2.10.1. Dünyada Tüberküloz	41
2.10.2. Türkiye’de Tüberküloz	42
3. MATERYAL ve YÖNTEM	43
3.1. MTBC Suşları	43
3.2. İlaç Duyarlılık Testleri	43
3.3. Moleküler Test Aşamaları	44
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	51
4.1. Bulgular	51
4.2. Tartışma	56
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	74

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Mikobakterilerin sınıflandırılması	9
Tablo 2.2. Runyon Sınıflandırması	15
Tablo 2.3. Woods ve Washington Sınıflandırması	16
Tablo 3.1. BD BACTEC™ MGIT™ 960 MGIT Tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları	43
Tablo 3.2. Spoligotiplendirme PZR protokolü	46
Tablo 3.3. 1,5X TMAC hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar	46
Tablo 3.4. 1X TMAC hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar	47
Tablo 3.5. TE hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar	47
Tablo 3.6. Hibridizasyon karışımı	47
Tablo 3.7. Hibridizasyon karışımına PZR ürününün eklenmesi	48
Tablo 3.8. Spoligotyping sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan Oktal kod anahtarı	48
Tablo 3.9. 15 lokus MIRU-VNTR metodu için kullanılan primerler	50
Tablo 4.1. ÇİD-TB İzolatlarının Kümelendikleri Spoligo Majör Soy, Klad ve SIT Kümeleri	53
Tablo 4.2. Spoligotip T1 kladına ait izolatların SIT kümelerine göre 15 lokus MIRU-VNTR profili	54
Tablo 4.3. Spoligotip Beijing kladına ait izolatların SIT kümelerine göre 15 lokus MIRU-VNTR profili	55
Tablo 4.4. Spoligotip LAM 7 TUR kladına ait izolatların SIT kümelerine göre 15 lokus MIRU-VNTR profili	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Mikobakterilerin hücre duvar yapısı	10
Şekil 2.2. MTBC'nin filogenetik ağacı	14
Şekil 2.3. MTBC soylarının filogenetik ve coğrafi dağılımı	19
Şekil 2.4. MTBC'nin yaşam döngüsü	23
Şekil 2.5. Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle boyanmış MTBC basilleri	29
Şekil 2.6. Mevcut TB ilaçlarının etki mekanizmaları	35
Şekil 2.7. DSÖ 2018 global bildirilmiş ÇİD-TB vakaları	42



KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
ARB	Asido Resistant Bacil
BCG	Bacillus Calmette Guerin
CFP	Culture Filtrate Protein
CR	Kompleman Reseptörü
CRISP	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
ÇİD-TB	Çok İlaç Dirençli Tüberküloz
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EMB	Etambutol
ESAT	Early Secretory Antigenic Target
ETR	Exact Tandem Repeat
EZN	Erlich Ziehl Nelsen
HCL	Hidroklorik Asit
HGT	Horizontal Gen Transferi
HIV	Human Immunodeficiency Virus-İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
Hsp	Heat Shock Protein-Isı Şok Proteini
INF	İnterferon
INH	İzoniazid
IS	Insertion Sequence
kDa	Kilo Dalton
LAM	Lipoarabinomannan
LM	Lipomannan
MGIT 960	Mycobacterium Growth Indicator Tube
MIRU	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
NaCl	Sodyum Klorür
NALC	N-asetil L-sistein
NAOH	Sodyum hidroksit
OT	Old Tüberkülin
PAS	Para-amino Salisilik Asit
PZR	Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIM	Fosfatidil inozitol mannozit
PPD	Purified Protein Derivative
PZA	Pirazinamid
RD	Region of Difference
RFLP	Mikobakteriyel insersiyon dizilerine dayanan restriksiyon parça uzunluk polimorfizm
RIF	Rifampisin
RRDR	Rifampin Resistance Determining Region
SAPE	Streptavidin-R-Phcoerythrin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SM	Streptomisin
TB	Tüberküloz
TCH	Tiyofen-2-Karboksilik Asit Hidrazid
TE	Tris-EDTA
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TMAC	Tetramethylammonium Chloride
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
YİD-TB	Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz

1. GİRİŞ

Eski çağ hastalıklarından birisi olan Tüberküloz (TB), morbidite/mortalitesi oldukça yüksek, hem insan hem de çeşitli türdeki memeli hayvanlarda enfeksiyon yapabilen, son yıllarda gerçekleştirilen moleküler çalışmalarla 11 bakteri türünden oluştuğu bilinen *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) tarafından meydana getirilen bir hastalıktır [1].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2019 küresel raporunda, tahmini 10 milyon (9–11,1 milyon) insanın TB ile mücadele ettiği bilgisinin yanı sıra 7 milyon yeni TB vakası olduğunun bilgisi verilmektedir. Yine aynı raporda 2018 yılında ortalama 1,2 milyon (1,1-1,3 milyon) insanın TB'den (HIV-negatif hastalar) dolayı öldüğü tahmin edildiği bildirilmiştir [2]. Tüm dünyada ölüm sebepleri içerisinde ilk 10 sırada yer alarak önemini koruyan, tek bir patojenin sebebiyet verdiği TB, enfeksiyon yeri olarak en çok akciğerlerde görülürken, diğer organları ve sistemleri etkileyebilir (lenf bezleri, kemikler, meninksler, vb.) [3]. TB, her iki cinsiyetten insanları ve tüm yaş gruplarını etkileyen bir hastalıktır. DSÖ raporlarına göre 2018'deki tüm TB vakalarının %57'sini 15 yaşından büyük erkekler oluştururken, %32'sini kadınlar, %11'ini ise 15 yaşından küçük çocuklar oluşturmaktadır. Coğrafi olarak ise TB vakaların dağılımı, Güneydoğu Asya'da %44, Afrika'da %24 ve Batı Pasifik'te %18 iken, Doğu Akdeniz'de %8, Amerika %3 ve Avrupa'da ise %3'tür. Sosyo-ekonomik ve çevresel faktörlere bağlı olarak küresel anlamda TB insidansını etkileyen etkenler arasında, 1980'lerde ortaya çıkan HIV/AIDS ile birlikte seyreden TB'nin yanı sıra antimikobakteriyallere karşı artan direnç de en önemli sorunlardan birisi olarak yer almaktadır [1].

Küresel TB insidansı 2003 yılı civarında pik yapmaya başlarken, aynı zaman diliminde izoniyazid (INH) ve rifampisine (RIF) direnç gösteren çoklu ilaç dirençli (ÇİD)-TB vakaları ortaya çıkmaya başlamıştır. DSÖ 2019 raporuna göre küresel olarak bildirilen toplam 186.772 ÇİD-TB vakası bulunmaktadır [2]. TB'nin önemli global bir sağlık problemi haline gelmesine neden olan hususlar artış gösteren ÇİD/yaygın ilaca dirençli (YİD)-TB insidansının yanı sıra, MTBC'nin ÇİD/YİD gelişme riski bulunan Çin kökenli Beijing suşları gibi suşların seyahat, göç vb. sebeplerle bütün dünyada hızla yayılım göstermesidir. Bu nedenle MTBC içinde bulunan tüm suşların tür düzeyinde tanımlanmaları ve dirençli suşların izlenmesi, yayılımlarının engellenmesi açısından öneme sahiptir [4].

Halk sağlığını temel alan TB epidemiyolojisi çalışmalarının amacı, hastalar arasında benzer izolatlar sebebiyle gerçekleşebilecek taşınma zincirlerini takip ederek izolatların moleküler tiplendirme sonuçlarını kişilerle bağdaştırmaktır. TB hastalığının tanısında 100 yıldan daha uzun bir süre önce geliştirilen balgam mikroskopisi ve altın standart olarak kabul edilen kültür bazlı yöntemlerin yanında 2010 yılında ilk kez DSÖ tarafından onaylanan hızlı moleküler testler de yerini almıştır [5].

Mikobakteriyel insersiyon dizilerine dayanan restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP), bakteri genomunda farklı sayılarda tekrarlayarak rastgele dağılım gösteren dizilerin polimorfizmini hedef alan MIRU-VNTR ve polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) dayanan spoligotiplendirme gibi temel olarak kullanılan üç moleküler metod vardır. Bu metodların her birinin avantaj ve dezavantajı bulunmakla birlikte; spoligotiplendirme yönteminin ayırım gücü MIRU-VNTR yöntemine göre daha düşüktür fakat küçük kitlelerde suşların iz sürümünde etkilidir. MIRU-VNTR diğer yöntemler içerisinde görece daha yeni bir yöntemdir. Halk sağlığına yönelik kalabalık kitlelerle yapılan çalışmalarda spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR kombinasyonunun kolay ve hızlı uygulanabilirliği sayesinde yeni altın standart olma ihtimali yüksektir [5].

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada Haziran 2018-Mayıs 2019 tarihleri arasında Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ankara Tüberküloz Ulusal Referans Laboratuvarı'na akciğer TB şüphesiyle gönderilen örneklerden izole edilen 96 ÇİD-TB izolatının genotipik özelliklerini spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile araştırdık ve karşılaştırdık. Çalışmamızdaki ncelikli amaç ülkemizde bulunan MTBC izolatlarının genotip düzeyinde tanımlanması ve genel olarak ülke dolanımında olan suşların dirence yatkınlığının sınıflandırılmasıdır. MTBC genotipinin belirlenmesi, genotip özelliklerin ilaç direnci üzerindeki etkilerinin bilinmesi açısından kritik öneme sahiptir.

Çalışmamızın ikincil amaı ise ileride de devam edecek olan epidemiyolojik çalışmalar için gerekli olan laboratuvar koşullarının alt yapısını oluşturmak, sürdürülecek genotiplendirme çalışmaları ile MTBC suşlarının ülkemizdeki hareketini takip ederek, var olan stratejilerin işleyişini sorgulayabilir sonuçlar üretilmesine imkân sağlayabilmenin yanı sıra yeni kontrol stratejileri geliştirmektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Tarihçe

Yunanca kökenli olan *Mycobacterium* kelimesi 'fungus' (myces) ve 'küçük çubuk' (bakterion) kelimelerinden türemiştir. Ayrıca sıvı besi ortamında küf şekline benzediğinden dolayı myces kelimesi bu bakteri isminde kullanılmıştır. Milattan önceki zamanlarda var olan Eski Babil ve Çin uygarlıklarının yazıtlarında, Mısır gibi uygarlıklarla ilgili yapılan fosil insan iskelet çalışmalarında ve mumya araştırmalarında TB omurga hastalığına dair kanıtlar bulunmuştur [6]. Son moleküler genetik araştırmalar ise yeryüzünde en sık görülen TB nedeni olan MTBC'nin yaklaşık 3 milyon yıllık bir progenitöre sahip olduğunu göstermiştir [7]. Neolitik zamana ait (8 bin ile 10 bin yıl önce) fosillerde yapılan incelemelerde, avcı hayvanlardan ve diğer doğal tehlikelerden TB olmuş büyük baş hayvanlarını korumak için onlarla yaşam yerlerini paylaşan insan topluluklarında, hastalık izlerine insan kemiklerinde rastlanılmıştır. Bu buluşla birlikte hayvandan insana geçiş hipotezi kısmen gösterilmektedir [6,8]. Bu bilgiye dayanarak, *Mycobacterium bovis* suşunun bir *Homo sapiens*'i enfekte ettiği ve başarıyla yayıldığı söylenebilir. Binlerce yıllık insan-bakteri uyumu evriminden sonra, yeni konağı üzerinde uzmanlaşan eski bakterinin insana özgü hale gelerek günümüzdeki *M.tuberculosis* formuna dönüştüğü düşünülmektedir [9,10]. Daha sonraları genotiplerinde küçük farklılıklar olan bir grup bakteriden oluştuğu keşfedilen MTBC, binlerce yıl boyunca süregelen evrimle zorunlu insan patojeni haline gelmiştir. Bazı araştırmacılar ise MTBC'i *arketipik* insan tarafından kendine adapte edilmiş patojen olarak görmektedir [17]. Patojenik olmayan toprak bakterilerinin ve fırsatçı patojen olabilen tüberküloz dışı mikobakteri türlerinin aksine, MTBC bilinen bir çevre rezervuarına sahip değildir ve insan konağı dışında hayatta kalamaz [11-14]. Geçtiğimiz 200 yıl içerisinde bir milyardan [15] fazla ölüme neden olan TB'yi atlatan ya da ölen popülasyon, bakterinin insan immün sistemine verdiği tepkiyi şekillendirmiştir [16].

Dr. Robert Koch'un 24 Mart 1882 tarihinde *M. tuberculosis* isimli basili keşfettiğini duyurmasıyla birlikte insanlık TB'nin sebebiyle tanışmış oldu [2]. Almanya'da 1854 yılında ilk sanatoryumun açılmasıyla TB tedavisinde farklı bir dönem başlamıştır. ABD ve Avrupa'da dağ eteklerinde ve bol oksijenli ormanlık alanlarda kurulan sanatoryumlarda hastalar için hafif egzersiz programları ve zengin bir diyet uygulanıp ve 8-12 saat süre ile taze dağ havası ile temas sağlanıyordu. Fakat TB basilinin de hasta kadar oksijenden faydalanması, sanatoryum kurulum mantığının tedavide etkisiz, hatta zararlı olabileceği düşüncesiyle yaygınlaştırma fikrinden vazgeçilmişti [18].

William Osler, 1909'da "TB hastalarıyla birlikte yaşayan herkesin enfekte olduğunu, ancak kendilerine baktıkları sürece tıpkı toprağın tohumun büyümesi için elverişsiz bir durumda

olması gibi yaşadıkları sürece iyi kaldıklarını” yazdı. 1920’de Devoto, sağlık çalışanlarında TB oluşma riskinin normal bireylere göre daha fazla olduğuna dikkat çekti. 1921 yılında Fransa’da Calmette ve Guerin isimli araştırmacılar Bacillus Calmette-Guerin (BCG)’i yani ilk TB aşısını geliştirdiler. 1930’lu yıllardan sonra F. Seibert tarafından saflaştırılarak elde edilen old tüberkülin ve elde edilen saflaştırılmış protein türevi (PPD) ile TB enfeksiyonunun varlığı saptanmaya başlanmıştır [19-22].

1934 yılında Wells TB hastalarında damlacık çekirdeklerinin havada buharlaşarak yayıldığını ifade etti. 19. yüzyılın sonlarına doğru Osmanlı İmparatorluğu’nda TB salgınları görülmeye başlamıştır. Balkan ve I.Dünya Savaşları’nda Anadolu’da yoksulluğun artmasıyla birlikte hastalık da hızla yayılırken, 1940’ların sonunda TB’ye bağlı ölüm en üst düzeye ulaşmıştır [20,23]. ABD’de Streptomisin (SM)’nin ve İsveç’te Para-Amino Salisilik Asit (PAS)’in 1940’ların ortasında bulunması ile TB için tarihte yeni bir dönem başladı. İlaçların tek başına kullanılmasından dolayı bir ay gibi kısa bir sürede oluşan direnç gelişimi önce büyük hayal kırıklığı yaratmış ancak bu durum yeni ilaç bulma çabalarını hızlandırmıştır. Robizek ve Selikof (ABD) tarafından 1952 yılında INH’in bulunmasının ardından 18-24 ay süren üç ilaçla kombine tedavi uygulaması ile TB hastalığı altı ayda tedavi edilebilir hale gelmiştir. Daha sonra 1954 yılında Pirazinamid (PZA), 1962 yılında ise Etambutol (EMB) keşfedildi. Riley 1961’de bakterilerin hava yoluyla yayılarak akciğerlere alınmasını tanımladı. 1960-1962’de ise basilin bir TB hasta servisinde havadan yayılarak bulaş yarattığını tarif etti. 1966 yılında ise RIF bulunmuştur. TB’de erken tanı, tedavi ve aşılama öneren TB kontrol programları DSÖ kontrolünde 1960’lardan sonra uygulanmaya başlanmıştır. Ülkemizde ise 1960 yılında çıkan bir yasa ile verem savaş dispanserleri kurulmuştur [21,22,24]. 1964 yılında Chapman, TB’den etkilenen ailelerde hastalığın geçişiyle ilişkili sosyal faktörleri tanımlamıştır. 1970’li yıllara gelindiğinde batı ülkelerinde TB sorununun artık bittiği düşünülerek kontrol programları gevşetilmiştir. Ancak HIV ile birlikte 1985 yılından itibaren TB insidansının yeniden artmaya başlaması bu ülkelerde TB kontrol programlarının, 1990’lı yıllarda yetersiz kaldığını göstermiştir [25,26]. 2000’li yıllardan itibaren ise küresel dolanımında olan MTBC suşlarının filocoğrafik sınıflandırmasını ve TB salgınlarının moleküler takibi için tüm genom diziliminin ortaya çıkarılması çalışmaları yeni çözümler üretebilmek için hızla devam etmektedir [4].

TB modern dünyamız için kritik bir sağlık sorunudur. Günümüzde dünyadaki ölüm sebebiyetlerinde ilk 10 sırada yerini alan, MTBC’nin oluşturduğu TB 2018 yılında 1.2 milyon insanın ölüm sebebi olarak gösterilmiştir. TB’nin etkilerini azaltmak için yıllarca süren koordineli küresel çabalara rağmen, 2017 yılında 10 milyon civarında yeni enfeksiyon geliştiği tahmin edilmektedir [2,27]. TB hastalığının önlenmesi için tek lisanslı aşı, BCG aşısıdır. BCG aşısı neredeyse 100 yıl önce geliştirilmiş olup çocuklarda ciddi TB biçimlerini önler ve yaygın olarak kullanılır. Yaklaşık 100 yıl önce etkili bir aşı bulunmasına rağmen, MTBC’nin küresel enfeksiyon

oranı hala yaklaşık üç kişiden biri olarak bilinir [28, 29]. İlaça duyarlı TB hastaları için şu anda önerilen tedavi ilk dört ilacın (INH, RIF, EMB ve PZA) 6 aylık rejimidir [30,31].

Günümüzde karşı karşıya kaldığımız durum, küreselleşmenin, diğer bir deyişle nüfusun artarak kontrolsüz dolanımı, göç, turistik aktiviteler ve iklimsel değişiklikleri kapsayan hareketlerin çarpıcı bir şekilde değişmesiyle; endemik olmayan suşlar tarafından enfekte olan hasta sayısının artması, ÇİD suşlarının sağlık hizmeti yetersizliği olan ülkelerden yayılması ve YİD suşlarının gün geçtikçe artması gibi birçok sonuç ortaya çıkmıştır. RIF dirençli ve ÇİD TB olan kişilerin tedavisi duyarlı hastaların tedavisine göre daha uzun ve daha pahalıdır. Üstelik kullanılması gereken ilaçlar daha toksiktir [32].

Dünya çapında, TB insidansı 2000 ile 2015 yılları arasında yıllık %2 düşmüştür. Fakat TB insidansı yüksek olan ülkelere diğer ülkelere göç eden kişi sayısındaki artış, diğer Avrupa ülkelerindeki düşük insidans oranını değiştirmektedir. TB insidansı 2015 yılında 100.000 kişi başına 5.1 vakaya yükselmiştir [33-36]. Bütün bu bilgilerin yanı sıra 2020 yılına kadar DSÖ'nün önderliğinde bütün dünyada yürütülen END TB stratejisinin ilk dönüm noktasına ulaşmak için TB insidansında yılda %4-5'lik bir düşüş yaşanması gerekmektedir [2]. Bütün bunlar göz önüne alındığında, MTBC soyları arasında gözlenen enfekte ediciliği ve ilaçlara direnç geliştirmelerini sağlayan yapılarını açıklayabilen genomik özelliklerini ortaya çıkarılması oldukça önem taşımaktadır [37-39].

TB genellikle sosyoekonomik krizlerin ve savaş yıllarının ardından hızla artış göstermiştir. Tarihsel süreç Anadolu bakımından irdelenecek olursa; Osmanlı İmparatorluğu'nda sağlık alanında yapılan kayıtlarda, 19. yüzyılın sonunda büyük bir TB salgınından bahsedilmiştir. Hastalıkla ve halkın fakirliğinden dolayı besin ve hijyen mahrumiyetiyle mücadele edilmesi birlikte bahsedilen bir süreç olmuştur. Bu sebeple hastaların bakım sağlanacağı ve aynı zamanda toplumdan tecrit de edileceği merkezler açılmaya başlanmıştır. Ülke genelinde görülen ekonomik sıkıntılar, Balkan Savaşları ve 1. Dünya Savaşı gibi halkın zorluklarla mücadele ettiği sıkıntıların yaşanması gibi durumlar TB salgının hızla yayılmasına sebep olmuştur. 1900'lü yılların ilk yarısında verem savaş dernekleri, verem savaş dispanserleri, sanatoryumlar ülke genelinde yaygınlaşmıştır. 1918 yılında "Veremle Mücadele Osmanlı Cemiyeti" kurulmuştur [40]. 1930 yılında "Umumi Hıfzıssıhha Kanunu" çıkarılmış ve kanunun "Memleket Dahilinde Sari ve Salgın Hastalıklarla Mücadele" başlığı altında ihbarı zorunlu hastalıklar tanımlanmıştır [41]. 1940'ların sonunda TB salgınının en yüksek düzeyine ulaşmasının ardından 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri [VSD] kurulana kadar TB ile etkili mücadele edilmeye çalışılmıştır. 1970'li yılların başında devlet tarafından yapılan resmi bilgilendirmelerde tüberkülozun kontrol altına alındığı şeklinde açıklamalar yapılmıştır. Yapılan resmi bilgilendirmeler hem devletin hem de halkın konuya ilgisinin giderek azalmasına neden olmuş ve bu durumun getirisi olarak 1977'den sonra yapılan çalışmalarda enfeksiyonun arttığı görülmüştür [40]. Küresel 2019 TB raporunda

Türkiye'nin 2018 yılı tahmini insidans hızı yüz binde 18 ve tahmini mortalite hızı yüz binde 0,62 olarak verilmiştir.

Türkiye'nin, 2015 yılı yeni ve nüks olgularda tedavi başarısı %87 ve önceden tedavi görmüş olgularda tedavi başarısı %46'dır. Ayrıca Türkiye ÇİD-TB açısından yüksek hastalık yüküne sahip 30 ülke arasında değildir. ÇİD-TB haritalarında Türkiye'de yeni TB olgularında RD/ÇİD-TB oranı %0-2,9 aralığında, önceden tedavi görmüş TB olgularında RD/ÇİD-TB oranı ise %12-29 aralığında verilmiştir [2].

Türkiye genelinde verem savaş dispanserlerine kayıt edilen tüm TB hastalarının 2005 yılından itibaren verileri bireysel olarak toplanarak analiz edilip raporlanmaya başlanmıştır. Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi 2006 yılında ülkemizde uygulanmaya başlanmıştır. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı tarafından hazırlanan, Türkiye'de Verem Savaşı 2018 Raporu'na göre; toplam 12.417 TB hastası 2016 yılında verem savaş dispanserleri kayıtlarına girmiştir. Toplam olgu hızı yüz binde 16,2'den yüz binde 15,6'ya (%4,1) düşüş göstermiştir. Olgu hızının yaş gruplarına dağılımı incelendiğinde, 15-24 yaş grubundan başlayarak yükseldiği, 65 ve üzeri yaşlarda en yüksek düzeye (yüz binde 33,3) ulaştığı görülmektedir. Erkek/Kadın oranı 1,3'tür. Hastaların 7.132'si (%57,4) erkek, 5.285'i (%42,6) kadındır. Olgu hızı erkeklerde yüz binde 17,8 ve kadınlarda yüz binde 13,3'tür. Toplam 12.417 hastada yeni olguların oranı %92,1 (11.442) iken önceden tedavi görmüş olguların oranı %7,9'dur (975). Önceden tedavi görmüş olguların toplam hasta içindeki oranları; %6 (744) nüks, %1,3 (167) tedaviyi terkten dönen, %0,5 (62) tedavi başarısızlığından gelen ve %0,02 (2) kronik olgudur. 2016 yılında akciğer tüberkülozu olan 8.248 hastada yapılan bakteriyolojik tetkikler incelendiğinde; mikroskopik inceleme yapılma oranı %93,5 (7.713), mikroskopik inceleme yapılanlar içinde pozitiflik oranı %59,8 (4.610); kültür yapılma oranı %87,1 (7.181), kültür yapılanlar içinde kültür pozitiflik oranı %81,5 (5.855); kültür pozitif olgularda ilaç duyarlılık testi yapılma oranı ise %96,0 (5.620) bulunmuştur. İlaç duyarlılık testi yapılan toplam 6.037 hastanın (5.620 AC+417 AC dışı) sonuçları incelendiğinde; %19,2'sinde (1.161/6.037) en az bir ilaca direnç saptanmıştır. En yüksek oranda direncin %11,9 ile (720/6.037) INH karşı geliştiği görülmüştür. INH ve RIF için (her ikisine) ilaç duyarlılık testi yapılan 6.028 olgunun 200'ününün (%3,3) ÇİD- TB olduğu tespit edilmiştir. İlaç duyarlılık testi yapılanlarda ÇİD-TB oranı yeni olgularda %2,1 iken (115 olgu), önceden tedavi görmüş olgularda %14,2 (85 olgu) olarak saptanmıştır. ÇİD-TB olgularından 9'u YİD-TB'dir (4 yeni olgu, 5 önceden tedavi görmüş olgu). YİD-TB olgularının 1'i Türkiye doğumlu, 8'i yabancı ülke doğumludur [42].

2.2. Mikobakterilerin Özellikleri

Mikobakteri türlerinin genomu, yaklaşık 4,4 milyon baz çifti büyüklüğünde olup, Guanin ve Sitozin (G+C) (%65-70) oranının yüksek olması ile Rhodococcus (%59-69) ve Nocardia (%60-69) gibi mikolik asit içeren diğer bakterilerle benzerlik gösterirler. Mikobakteri türleri arasında genetik materyalin yatay (horizontal) gen transferi (HGT) olaylarıyla değişimi çok nadir görülmesine rağmen [43] bütün mikobakteri basillerinin atası, türünün evrimine katkıda bulunabilecek şekilde kendisiyle ilişkisiz çevresel bakterilerle büyük genetik değişim olaylarını HGT ile gerçekleştirmiştir [44,45]. Bu durum tür içerisinde klonal evrimle sonuçlanmıştır [43]. Yapılan çalışmalarda, bu türün bazı genomik adalarının, Rv0986-8 operonu gibi virülans işlevlerine sahip çeşitli genleri taşıdığı belirlenmiştir. Bu durum araştırmacılar tarafından klonal evrim sürecinde, muhtemelen bir proteobakteriyel türden bu özellikleri elde ettiği şeklinde düşünülmektedir [46-48].

Mikobakteriler fakültatif aerob, kapsülsüz, katalaz aktifliği gösteren, hafif kıvrık veya düzgün çomak şeklinde, 0.3-0.6 µm eninde, 1.0-10 µm boyunda ince hücre içi yaşayan basillerdir [43]. Mikobakterilerin optimum üreme şartları pH 5-6 aralığında, %5-10 CO₂ içerikli ve sıcaklığın 37°C olduğu ortamdır. Hücre duvarının lipid içeriği oldukça fazla olduğundan alkol, asit, alkali ve kuru ortama karşı direnç gösterir. Basiller 18-24 saatte bir bölünür ve yaklaşık 10-15 günde gözle görülür büyüklükte, deve tüyü renginde, karnabahar şekline benzeyen, buruşuk düzensiz koloniler oluşturmaya başlar [49]. Mikobakteriler Gram (-) ya da (+) olarak sınıflandırılmaz. Birçok bakteri %95 etil alkol ve %3 hidroklorik asit (asit- alkol) ile dekolarize olurlarken mikobakteriler bu şekilde davranmazlar ve bu sebeple "asit dirençli basil" olarak adlandırılırlar. Mikobakterilerin hücre duvar yapılarındaki hidrofobik lipid miktarı oldukça yüksek olduğundan dolayı aside dirençlidirler. Gram (+) bakterilerde lipid içeriği %0,5 oranında iken Gram (-) bakterilerde bu oran %3'tür. Mikobakterilerin duvarındaki lipid içeriği ise %25'tir [50]. Mikobakterilerin hücre duvarlarının yüksek lipid yapısı, Gram boyamada kullanılan anilin boyaların geçişine izin vermediğinden dolayı fenol içinde çözündürülen bazik fuksinin yoğun eriyikleri ile boyanırlar. Kinyoun veya Ehrlich- Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemleri ile boyanarak mikroskopta görünür hale getirilen mikobakterilerin dekolorizasyonunda tek başına alkol kullanımı yetersiz olup %3'lük asit-alkol uygulanır, bu uygulamaya rağmen ilk boya hücre duvarında kalır [51-53]. Kinyoun veya EZN boyama yönteminde dekolorizasyon işleminden sonra zıt boya olarak metilen mavisi kullanılır. Bu boyama yöntemleri kullanılarak mikroskopik inceleme yapıldığında, TB basilleri mavi zeminde kırmızı çomaklar şeklinde görülür. Mikobakteri basillerinin birbirlerinden ayrılmayarak, yılankavi şeklinde oluşturdukları yapıya trehaloz dimikolat-kord faktör (serpentine cord) adı verilir ve kord faktör yapıları mikroskop incelemesinde demetler şeklinde görülebilir [54,55].

2.2.1. Mikobakterilerin Hücre Yapısı

Mikobakterilerin hücre yapısı sitoplazma, plazma zarı ve lipid içereği yüksek hücre duvarından oluşmaktadır. Sitoplazmik yapıları incelendiğinde prokaryot özelliği gösteren mikobakterilerin plazma zarının lipid içeriğinde monofosfoinositoller, kardiolipin, ve fosfatidiletanolamin bulunduğu gösterilmiştir [56,57]. Hücre duvarındaki diğer serbest glikolipitler olan fosfatidil inozitol mannozid (PIM), lipomannan (LM) ve lipoarabinomannan (LAM) sitoplazmik membranla ilişkili şekilde dış ortama doğru uzanır. Hücre duvarının en dışında bakteriye şeklini veren hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandıran peptidoglikan yapı bulunmaktadır [25,50]. Lipomannan ve LAM'ın öncü molekülü olarak bilinen PIM'in de konağın granulomatöz yanıtının ortaya çıkışında rol alan ayrıca fagositik olmayan hücrelere basilin bağlanmasını sağlayan bir adezin molekül olarak davrandığı gösterilmiştir [51]. Son yıllarda yapılan araştırmalar, MTBC'nın hücre duvarında, protein ve polisakkaritlerden (glukan, arabinomannan, mannan) oluşan bir kapsülün ve Gram (-) bakterilerdeki gibi hidrofilik moleküllerin geçişine izin veren porinlerin bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca yakın zamanda, hücre zarında; aminoglikozid ve tetrasiklin direnciyle ilişkili olarak, Tap ve P55; INH direnciyle ilişkili EfpA ve kinolon direnciyle ilişkili LfrA pompa proteinlerinin varlığı gösterilmiştir [50]. Oldukça kompleks bir yapıya sahip mikobakteri hücre duvarı üç tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.1) [59];

1-Peptidoglikandan [mürein] oluşan plazma zarı üzerindeki iç tabaka: Bu tabaka çapraz bağlarla bağlanan polisakkarit zincirleri ile kısa peptid zincirlerinden oluşur, hücrenin sert olmasını sağlar [59].

2- Arabinogalaktan tabakası: Bu ikinci yapı peptidoglikan tabakanın üzerinde bulunur ve bu tabakaya fosfodiester bağlarıyla bağlıdır. Arabinogalaktan (AG) yapısına, siklopropan halkalarından oluşan ve uzun alkil yan zincirleri taşıyan mikolik asitler hücre duvarı kalınlığından ve hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Hücre yüzeyinin hidrofobitesini arttıran mikolik asitler trehaloz gibi şekerlere bağlanarak Kord faktörü oluşturur. Kord faktörü olarak da bilinen trehaloz-6,6'-dimikolat, immünostimulatuvar özellikte bir moleküldür ve akciğerde granulom oluşumunu indüklediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Hücre duvarının %35'i AG tabakasından meydana gelir [58].

3- Dış tabaka: Mikoizidler olarak adlandırılan fenolik glikolipidden veya bir grup heterojen peptidoglikolipidlerden meydana gelir. Lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitlerinden meydana gelerek hücre duvarı ağırlığının %60'ını oluşturur [52,53,55]. Mikobakteriyel hücre duvarı çekirdeği, birbirine bağlı üç makromolekülden oluşur: peptidoglikan, AG ve mikolik asitler. Mikolik asitler, hücre duvarının en dıştaki bileşenleridir. Mikobakterilere ve ilgili taksonlara özgü olan ve mikobakteriyel zarfın yapısında ve mikobakteriyel virülansta önemli bir

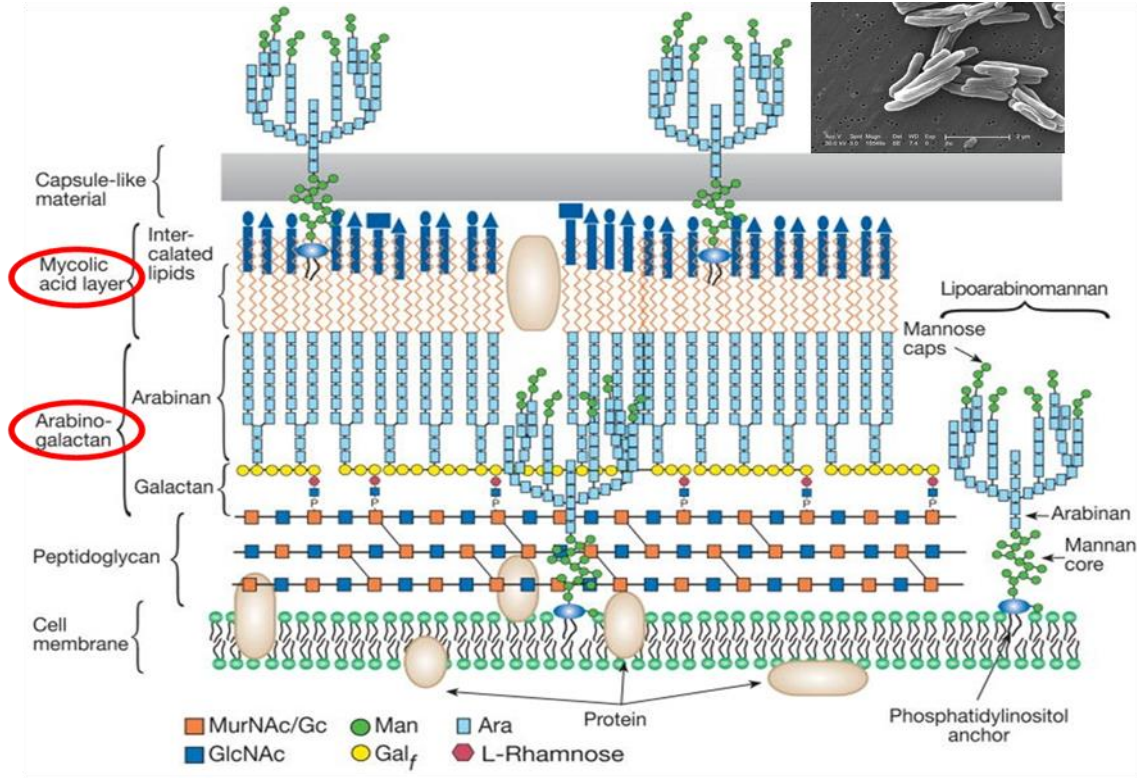
rol oynadığına inanılan uzun zincirli α -alkyl- β -hidroksi yağ asitleridir. Mikolik asitler esterleştirme yoluyla heteropolisakarit, öncelikle D- arabinofuranosil ve D- galaktofuranosil kalıntılarından oluşan AG'ye bağlanabilir. Bu polimerin tamamı (mAG), benzersiz bir bağlayıcı disakarit fosfat ile peptidoglikanın bir muramik asit tortusuna bağlanır. AG, mikobakteriyel hücre duvarı montajında çok önemli bir rol oynar [59]. Hücre duvarındaki diğer serbest glikolipitler olan PIM, LM ve mikobakterilerin ana karbonhidrat antijeni olan LAM sitoplazmik membranla ilişkili şekilde dış ortama doğru uzanır. LAM, dallanmış arabinan polimerlerinden oluşan mannan çekirdeğine sahiptir. LAM'ın mannan çekirdeği, palmitik, tüberkülearearik ve stearik asit kalıntıları [18,19] içeren bir mannosil fosfatidil-inositol [MPI] lipit parçasına kovalent olarak bağlanır [20]. Dallanmış arabinan zincirlerinin uçlarında mannos kapakları bulunur. Yapılan çalışmalarda mikobakterilerin hücre duvar yapısında hidrofilik moleküllerin geçişine izin veren porinlerin (OmpATb) bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, hücre zarında kinolon direnciyle ilişkili LfrA, aminoglikozid direnciyle ilişkili olarak Tap, tetrasiklin direnciyle ilişkili P55 ve INH direnciyle ilişkili EfpA pompa proteinlerinin varlığı gösterilmiştir [58, 60]. LAM ayrıca, mikobakteriyel hücre duvarının ana bir bileşenidir ve bakteriyel öldürmede önemli bir rol oynayan makrofajlardan tümör nekroz faktörü salınımı indüklediği gösterilmiştir [51].

2.3. Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Mikobakteriler, Mycobacteriaceae ailesinin üyeleridir ve tek genusu Mycobacterium spp'lerdir (Tablo.2.1). Bakteriyolojik özellik ve DNA benzerlik yönlerinden dolayı yakın ilişkili türlere 'kompleks' adı verilir ve *M. tuberculosis* genetik özelliklerinden dolayı kendisine benzeyen bir grup türle birlikte kompleks üyesidir [62].

Tablo2.1. Mikobakterilerin sınıflandırılması [62].

Alem	Prokaryot
Bölüm	Firmicutes
Sınıf	Actinobacteria
Takım	Actinomycetales
Aile	Mycobacteriaceae
Cins	Mycobacterium
Tür	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>



Şekil.2.1 Mikobakterilerin hücre duvar yapısı [59].

MTBC'nın en eski ortak atalarının Doğu Afrika'da ortaya çıkan ve insan göçüyle dünyaya yayılan bir patojen olduğu düşünülüyor [63]. Bu ortak atanın klonal evriminin, restriksiyon ile kaybedilmiş "farklılaşma bölgeleri" (RD) olarak adlandırılan gen bölgelerinin oluşumu ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ile meydana geldiği ileri sürülmüş ve bunun sonucunda bazı patoadaptif MTBC soylarının ortaya çıktığı düşünülmüştür. Evrimleşme ile meydana gelen bu tür değişiklikler, konakta hayatta kalma ile ilgili özelliklerin modifikasyonu yoluyla belirli soyların adaptasyonunu geliştirmiş ve yeni konakçı nişlerinde yerleşebilmeyi ve enfeksiyon oluşturabilmelerine izin vermiştir [45]. Hem konak hem de patojenin genetik geçmişine ek olarak, ekolojik faktörler yeni bir türde patojenin oluşumuna katkıda bulunabilir. Bunlar arasında coğrafi dağılım, nüfus yoğunluğu ve potansiyel konakçıların temas oranları bulunmaktadır. Ayrıca insanların bir arada yaşam ve uzun ömürlü olmak gibi davranış ve yaşam öyküsü özellikleri hastalık epidemiyolojisini etkileyebilir [64].

2.3.1. *Mycobacterium tuberculosis complex* [MTBC]

MTBC içerisinde yer alan türler, nükleotit seviyesinde %99'dan daha fazla genetik benzerliğe sahipken, coğrafi dağılımlarına göre konak tropizmi, fenotip ve patojenite açısından büyük farklılıklar gösterir [65,66]. MTBC birçoğu konağa adaptasyon ile farklılaşmış, sadece biri ise kültürlenme yoluyla adaptasyonu değiştirilmiş suş olan *M.bovis* Bacillus Calmette-Guérin ile birlikte 11 üyeden oluşur (Şekil 2.2.). Spoligotiplendirme gibi yöntemlerle genotipik olarak *M. tuberculosis* farklı filogenetik soylara ayrılmıştır [69]. İnsan enfeksiyonu ile ilişkili MTBC suşları, *M.tuberculosis*, *M. africanum*, *M.canetti* 'dir [64].

Mycobacterium tuberculosis: Robert Koch tarafından 1882 yılında tanımlanan basil, insan tüberkülozunun en yaygın etkenidir. Damlacık yoluyla yayılan *M.tuberculosis* makrofaj hücreleri içerisinde yaşamlarını sürdürür ve çoğalır. İlk başlarda yapılan araştırmalarda *M.tuberculosis*'in *M.bovis*'ten köken alarak hayvandan insana adapte olmuş versiyon olduğu ifade edilse de, son genomik çalışmalar *M.bovis* genomunun *M.tuberculosis* genomundan daha küçük olduğunu ve bu durumun ise evrimsel süreçte daha genç bir bakteri olduğundan kaynaklandığı ifade edilmiştir [65]. TbD1 delesyonu ile atasal suştan ayrılan *M. tuberculosis*'in konağı insandır. Aerop bir bakteri olan *M. tuberculosis* katı besiyerlerinde R tipi koloni oluşturarak, 37°C'de 2-4 haftada ürer. Sıvı besiyerinde kord faktör oluşturan *M. tuberculosis* pigmentsizdir. Nitratları nitritlere indirgeyebilir ve Niasin testi pozitifdir. Tiyofen-2-karboksilik asid hidrazid içeren ortamda üreyebilir. 68°C'ye kadar katalaz testi pozitifdir daha yüksek sıcaklıkta bu özelliğini yitirmekle birlikte p-nitro-asetilaminohidroksi propiyofenon (NAP) içerir. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir [67,68].

Mycobacterium africanum: 1968'de ilk kez tanımlanan [70], çoğunlukla Afrika kıtasındaki akciğer TB vakalarının %60'ından sorumlu tutulan MTBC üyesidir [71,72]. Özellikle hem insan hem de vahşi hayvanlarla ilişkili olan, genomdaki RD9 bölgesinin kaybı ile karakterize edilmiş farklı suşları olan tek soy *M. africanum*'dur [65].

Mycobacterium canetti: Çok nadir bir biyotip ve çevresel bir izolattır. İnsanlarda nadir ve sporadik TB sebebi olarak tanımlanır. Düzgün bir koloni morfolojisine sahip bu varyant ilk olarak 1969'da Canetti tarafından Somali doğumlu bir hastadan izole edilmiştir [73,74].

Mycobacterium bovis* ve *Bacillus Calmette-Guérin: Sığırlarda görülen TB'nin sebebidir fakat insanların da içinde yer aldığı diğer memeli türlerinde de TB'ye sebep olur. Katı ve sıvı besiyerlerinde, aerob şartlarda 6-8 haftada ürer. Piruvat eklenen besiyerinde üremesi artar. Katı besiyerinde R veya S koloni şeklinde görülür. Güçlü katalaz aktivitesi gösterirken niasin reaksiyonu vermez ve nitratları nitrite indirgemez. Pirazinamidaz aktivitesi yoktur. *M.bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* Calmette ve Guérin tarafından TB'yi önlemek için geliştirilen *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) aşısı ilk kez 1921'de insana uygulanmıştır. *M. bovis* sokak suşunun in-vitro şartlarda 230 defa pasajlanarak atenüasyonu ile elde edilmiş ve zayıflatılmış canlı formu olan aşı,

TB'ye karşı kullanımda olan tek aşıdır. Küresel olarak en yaygın şekilde uygulanan aşıdır ve genellikle rutin yeni doğan bağışıklama programının bir parçasıdır. Bu aşı ayrıca mesanenin yüzeysel karsinomunun tedavisinde de kullanılır [75].

Mycobacterium pinnipedii: İlk kez 1993 yılında deniz aslanlarından izole edildi. [76] Güney yarımkürede birkaç fok türünde, deniz aslanları gibi deniz memelileri ile tapirler ve develerde endemik TB'ye sebep olduğu bilinmektedir [77]. Deniz memelileriyle yakın temas halinde olan bireylerden izole edildiği bilinmektedir. [78, 79].

Mycobacterium microti: Doğal konakçısı özellikle tarla fareleri ve diğer küçük kemirgenlerdir, oldukça nadir de olsa diğer memelilerde de TB'ye sebep olur. İlk olarak 1998 yılında immün sistemi baskılanmış hastalarda bildirilmiştir [74]. *M. microti* enfeksiyonunun insandan insana geçişinin nadir olduğu bildirilmektedir. Diğer MTBC üyelerinden farklı olarak S koloni yapar, fazlasıyla yavaş ürerler [80].

Mycobacterium caprae: İlk olarak İspanya'da keçilerden izole edilen bu basil, keçi tüberkülozunun dünya çapındaki baskın sebebidir, domuz ve kızıl geyik, insanların da dahil olduğu diğer memelilerde, vahşi ve evcil hayvanlarda TB'ye sebep olur [81,82]. Hayvancılıkla uğraşan bireylerden vaka bildirimini yapılmıştır [81]. Bilindiği kadarıyla bu patojen, Avustralya'da tanı almış fakat normalde Avrupa'da yaşayan bir vaka [83] ile Cezayir'de bu patojenin izole edildiği bir inek dışında, hiçbir zaman Avrupa kıtası dışında izole edilmemiştir [84]. Uzun süre boyunca biyokimyasal test özellikleri benzediği için *M. bovis* olarak kabul edilen bu varyant spoligotiplendirme ile *M. caprae* olarak tanımlanmıştır [85].

Mycobacterium mungi: Botswana ve Kuzey Batı Zimbabve bölgesinde yaşayan bantlı firavun farelerindeki tüberkülozun sebebi olarak gösterilir [86]. Patojen koku alma esnasında bulaşan enfekte sekresyonlar yoluyla bulaşır. 2013 yılında enfekte farelerle yapılan çalışmada süşun genomik yapısı incelenerek *M. mungi* olarak tanımlanan patojenin MTBC içerisinde yer alması gerektiği belirtilmiştir. Basiller, konakçıya nazal planumunda oluşan erozyonlar yoluyla girer ve enfeksiyon sistematik olarak lenfatik veya hematojen yolla yayılır. *M. mungi* piruvatla zenginleştirilmiş Lowenstein-Jensen besiyerinde 5-6 haftada üretilebilir [64].

Mycobacterium suricattae: Bir çöl faresi izolatıdır. *M.mungi* ile ortak atayı paylaşır. Kısa süre önce tanımlanan bu kompleks üyesi Dasse bacillus ile genomik olarak yakındır. BACTEC MGIT ortamında da izolasyonu gerçekleştirilen bakteri, piruvat ile zenginleştirilmiş LJ besiyerinde 10 haftaya kadar kültürü izlendiğinde ancak yeterli koloni oluşturduğu bildirilmiştir. *M. suricattae* MTBC üyeleri arasında hiçbir spoligotip kalıbına uymamasıyla benzersizdir [87,88].

Dasse bacillus: MTBC'nin nadir görülen varyantlarından olan ve yapısı en çok *M.microti*'ye benzeyen Dasse Bacillus, Güney Afrika Damanları'nda (*Procavia capensis*) görülen TB'nin sebebi olarak bilinir. İlk kez 1954 yılında Nieu-Bethesda, Güney Afrika'da izole edilmiştir [89]. Yapılan çalışmalarda kobaylar için patojenik olmadığı bildirilen bu türün insanlardaki

enfeksiyonu henüz gösterilememiştir. Dasse basili, gliserol içermeyen dorset yumurta besiyerinde 4-6 hafta içerisinde gözle görülür koloni oluşturmuştur [64].

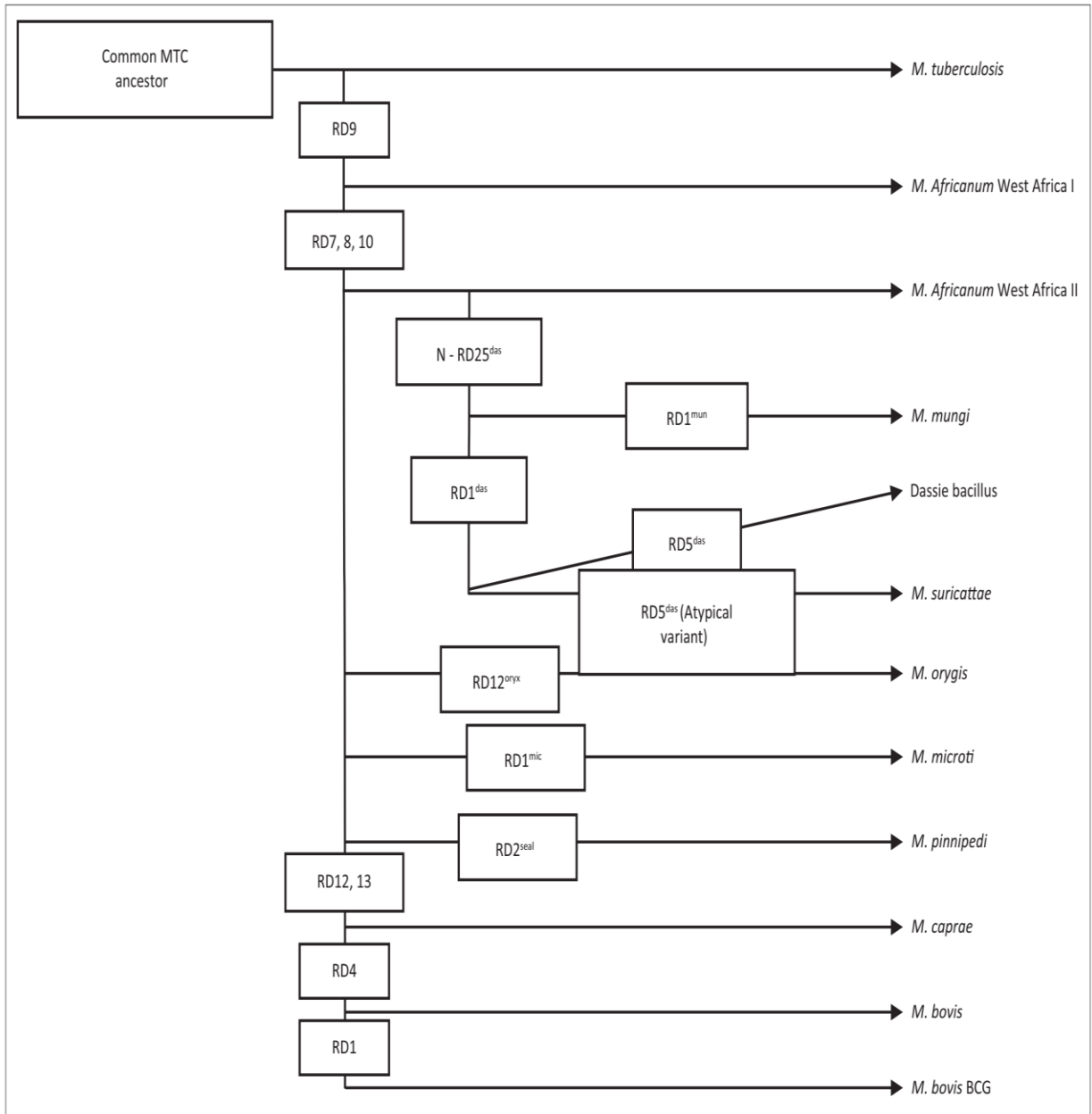
Mycobacterium orygis: 2012 yılında tanımlanmıştır. Afrika'daki potansiyel konakları olan orkiser, su kuşları ve ceylanlar ile Güney Asya'da yaşayan bovinler ve rhesus maymunlarında ve daha az bilinen nadir türlerde TB'nin sebebi olarak gösterilir [90-92].

MTBC grubun dışında kalan türler ise, Tüberküloz Dışı Mikobakteriler [TDM] 'ler olarak isimlendirilirler [93,94]. TDM'ler 1882 yılında Robert Koch TB basili tanımladıktan hemen sonrasında tanımlanmış olsalar da 1950'li yıllara kadar insanlarda patojen olabileceği düşünülmemiştir. Günümüzde 140'tan fazla TDM türü bilinmekle birlikte bunlardan 50'ye yakını insanlarda fırsatçı patojen olarak tanımlanmıştır. Ernest Runyon, 1950'lerin sonlarına doğru katı besiyerinde üreme ve pigment oluşturma özelliklerine göre TDM'leri (Tablo 2.2.) sınıflandırmıştır [94].

Runyon sınıflandırmasına göre;

- Runyon I (fotokromojenler): Yavaş ürerler, ışıpta pigment oluştururlar;
- Runyon II (skotokromojenler): Yavaş ürerler, ışıpta ve karanlıkta pigment oluştururlar;
- Runyon III (nonfotokromojenler): Yavaş ürerler, zayıf pigment oluştururlar veya hiç pigment oluşturmazlar;
- Runyon IV (hızlı üreyenler): 24°C ve 37°C'de 7 günde koloni oluştururlar.

1987'de Woods ve Washington, Runyon'un yaptığı sınıflandırmayı eksik bularak *M. tuberculosis*'i de içerisine alan klinikle uyum gösteren Tablo 2.3.'de verilen sınıflandırmayı önermiştir [95].



Şekil.2.2 MTBC'nin filogenetik ağacı [64].

Tablo 2.2.Runyon Sınıflandırması [94]

Mycobacterium	Klinik belirti	Pigmentasyon	Üreme
Sınıflandırılmayan			
<i>M. tuberculosis</i>			
<i>M. ulcerans</i>			
<i>M. bovis</i>			
<i>M. leprae</i>			
Runyon Grup 1			
<i>M. marinum</i>			
<i>M. kansasii</i>	Genelde patojen	Fotokromojen	Yavaş
<i>M. simiae</i>			
Runyon Grup 2			
<i>M. scrofulaceum</i>	Nadir patojen	Skotokromojen	Yavaş
<i>M. gordonae</i>			
<i>M. xenopi</i>			
Runyon Grup 3			
<i>M. avium intracellulare</i>	Fırsatçı patojen	Nonkromojen	Yavaş
<i>M. avium</i>			
<i>M. haemophilum</i>			
Runyon Grup 4			
<i>M. fortuitum</i>			
<i>M. chelonae</i>	Nadir patojen	Nonkromojen	Hızlı
<i>M. abscessus</i>			

Tablo 2.3. Woods ve Washington Sınıflandırması [95]

Klinik önemi olan mikobakteriler	<i>M. tuberculosis</i> kompleks <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> [<i>M. bovis</i> BCG] <i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> <i>M. canetti</i>		
İnsanda potansiyel patojen olan mikobakteriler	<i>M. avium-intracellulare</i> kompleks <i>M. xenopi</i> <i>M. fortuitum-chelonae</i> kompleks <i>M. kansasii</i> <i>M. scrofloceum</i> <i>M. szulgari</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. genavense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. celatum</i>		
İnsanda nadiren hastalık yapan saprofitik türler	Yavaş Üreyenler <i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae-triviale</i> kompleks <i>M. shimoidei</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i>	Orta Hızda Üreyenler <i>M. flavescens</i>	Hızlı üreyenler <i>M. thermoresistible</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. Paraafortuitum</i> kompleks

2.4. MTBC Soyları

İnsana adapte olmuş ekotipleri olan MTBC (soy 1-4 ve 7), *M. africanum* (soy 5 ve 6) ve *M. canettii* ve hayvana adapte olmuş ekotipleri içeren sekiz ana soydan oluşur. Bu soylar; Doğu Afrika, Filipinler ve Hint-Okyanusya (soy 1) Doğu Asya / Pekin (soy 2), Doğu Afrika-Hint / CAS (soy 3), Avrupa-Amerika (soy 4), Batı Afrika 1 ve 2 (soy 5 ve 6) ve Etiyopya'dan (soy 7) meydana gelmektedir [96]. Soy-7 yakın zamanda Etiyopya'da ve Cibuti'deki Etiyopya göçmenleri arasında tespit edilmiştir [97,98]. En eski atasal soylar (soy 1, 5, 6 ve 7) Batı Afrika (soy 5 ve 6) ya da Doğu Afrika'ya (soy 1 ve 7) bağlıdır. Buna karşılık, yakın zamanda farklılaşmalar gösteren modern soylar olarak ifade edilen soylar Asya (soy 3) veya kıtalar arası gibi daha geniş alanlarda (soy 2 ve 4) dağılım göstermektedir. Soy 2 atalarının alt dalları genellikle Doğu Asya hastalarıyla ilişkilendirilirken, aynı soyun modern alt dallarındaki suşlar en sık Doğu Avrupa ya da Orta Asya hastalarından izole edilmektedir [96]. MTBC genotipinin ve bağlı olduğu soyun belirlenmesi, aşı etkinliği ve ilaç direnci belirleme gibi durumlar için TB kontrol çalışmalarının tasarlanmasında oldukça kritik öneme sahiptir. Aslında ana soy altında şekillenen alt soylar, virülans, konak tepkisi ilaç direncinin ortaya çıkması gibi farklılıklar ile geniş coğrafi alanlarda yayılma ve suşa özgü genomik çeşitlilik göstermektedir (Şekil 2.3) [99].

2.4.1.Soy 1-Doğu Afrika, Filipinler ve Hint Okyanusu (EAI)

Güney Doğu Asya, Hindistan ve Batı Afrika'da sık görülür. Soy 1.1 (EAI3, EAI6(Bangladeş/1)), EAI7 (Bangladeş/2), EAI8-Madagaskar] ve Soy 1.2 (EAI1 ve EAI2 (Nonhaburi)) olarak belirtilen iki doğal alt soy, kendine özgü spoligotip kompozisyonu içerir [99].

2.4.2.Soy 2-Doğu Asya

Muhtemelen Doğu Asya'da ortaya çıkan bu soy son zamanlarda dünyanın farklı bölgelerinden bildirilmektedir [100]. Beijing, Beijing-like ve New York W olmak üzere 3 klad içerir [101]. Beijing soyu, Avrupa ve Asya'da yüksek virülans ve ilaç direncinin yayılması ile ilişkilendirilmektedir. Bu fenotip, seçilen genlerde pozitif SNP seçimiyle ilişkili görünmektedir ve sebebi bilinmemektedir. Doğu Asya dışında, modern Beijing soyları özellikle Doğu Avrupa ve Afrika'dan bildirilmektedir. Bu modern Beijing soyundan olan suşları, yüksek ilaç direnci, hastalığın hızlı ilerlemesi ve artan bulaşma oranları ile karakterize edilmektedir [102]. BCG aşısının Beijing soyundan gelen suşlara karşı koruyuculuğunun daha az olduğu görülmektedir [103].

2.4.3. Soy 3-Doğu-Afrika-Hindistan Orta Asya [CAS]

Sahra altı ülkelerinde ve Pakistan'da oldukça yaygındır. Soy 3'e ait izolatlar, CAS'a özgü bir RD750 delesyonunu barındırır. Bu spoligotip CAS1-Delhi, CAS1-Kili, CAS ve CAS266 gibi çok sayıda değişkene ve alt soya sahiptir. CAS1-Delhi dışındaki alt soylar CAS1-Kili ve CAS / CAS266'ya bölünmüştür [103].

2.4.4. Soy 4-Avrupa/Amerika

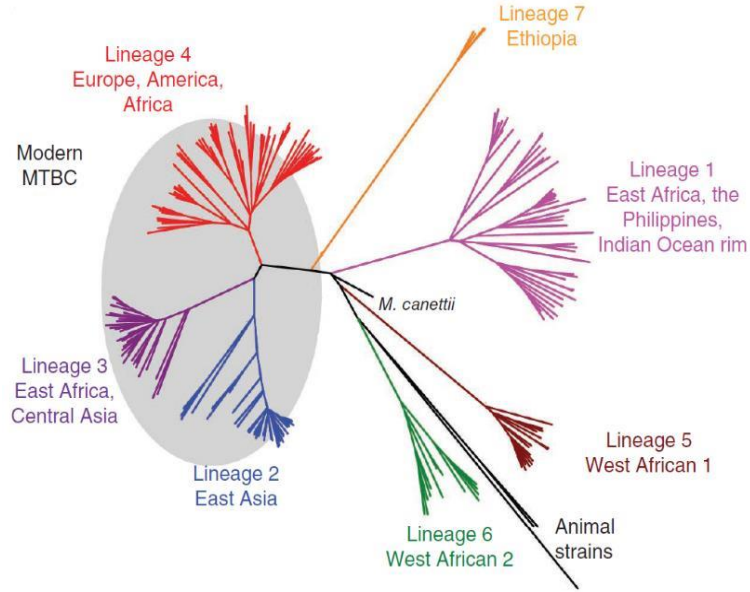
Soy 4 Haarlem, Latin Amerika ve Akdeniz (LAM), T, Ural, MANU, S ve X kladının da içinde olduğu 10 alt soydan oluşmaktadır. Günümüzde, Amerika'daki TB vakaları genellikle Avrupa-Amerikan soyu olarak da 4. soydan kaynaklanmaktadır. Diğer soyların aksine bütün dünyada yaygın olarak görülen bir ailedir. Soyun bu başarısı birçok faktör yanında yüksek genetik ve fenotipik çeşitlilik ile birlikte gelişmiş virülans özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Kıtalar arasında dahi yaygın görülebilen epidemiyolojik bir çeşitlilik de yaratmaktadır [102]. Haarlem (H), Kuzey Avrupa'da oldukça yaygın, Karayipler ve Orta Afrika'da daha az görülen kladdır. LAM kladı, özellikle Akdeniz ve Latin Amerika ülkelerinde sıkça görülen soy 4'ün majör bir üyesidir. T kladı soyun diğer alt gruplarından farklı olarak modern suşlar tarafından oluşturulan, diğer tüm alt gruplara sınıflandırılması zor olan suşları içerir [103]. X kladı Guadeloupe ve Fransız Polinezyası'nda tanımlanan ilk kladdır. Genellikle Amerika kıtasında görülen bu alt soyda kümelenen suşlar, Asya, Avrupa ve Güney Afrika'da daha az görülür [102].

2.4.5. Soy 5 ve 6-Africanum 1 ve Batı Africanum 2

Comas ve ark. [104], yaptığı çalışmada "*M. africanum* olarak adlandırılan türün MTBC soyunun genomik olarak en bazal formu olduğunu belirtmiştir. Bu iki soy, neredeyse yalnızca Batı Afrika'da görülmektedir. Afrika MTBC soylarının tümünü barındıran dünyadaki tek bölgedir [105]. Başka bir deyişle, Afrika dünyadaki en geniş insan adapte MTBC çeşitliliğine sahipken bu iki soyun neden Batı Afrika popülasyonları ile coğrafi olarak sınırlandığı henüz bilinmemektedir [106].

2.4.6. Soy 7-Etiyopya ve Cibuti

Şimdiye kadar, Afrika Boynuzu'ndaki ülkelerden izole edilen suşları kümeleyen bu soy MTBC'nin eski ve modern soyları arasındaki ara filojenetik bir dalı temsil etmektedir [107].



Şekil.2.3 MTBC soylarının filogenetik ve coğrafi dağılımı. “Modern” soylar olarak adlandırılan 2,3 ve 4 soyları gri renkle vurgulanırken, kalan soylar “antik” soyları temsil etmektedir. Hayvan soyları, kompleksteki monofilik bir dalı temsil etmektedir [99].

2.5 Virülans

Makrofaj aktivasyonu, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu, granülom oluşturulma ve immüno süpresyon gibi MTBC'nin özellik ve etkileri bulunan proteinleri, lipidler ve polisakkaritler immünojenik özellik göstermektedir [108].

2.5.1. Mikobakteriyel Proteinler

Old Tuberkülin: İlk kez Koch tarafından elde edilen Old Tuberkülin (OT), MTBC basillerinin kültür ekstraktıdır. Sıvı besiyerinde 37°C'de 6-8 hafta üretilmesini takiben akım halindeki buharla öldürülmesi, ilk hacminin 1/10'u kalıncaya kadar ısıyla yoğunlaştırılması ve filtrasyonla sterilize edilmesi sonucu elde edilen ve saf olmayan bir üründür. Interdermal cilt testlerinde kullanılan, sadece mikobakteriyel proteinler içermemesi nedeniyle saflaştırılmasına gerek duyulmuş ve PPD'nin gelişimine olanak sağlamıştır [53,108].

Saflaştırılmış Protein Derivesi: İlk kez Seibert ve Glenn tarafından tanımlanmıştır. Saflaştırılmış protein derivesi (Purified Protein Derivative-PPD), MTBC kültür ekstraktının amonyum sülfatla çöktürülme ve kollodyon membranlardan süzdürme gibi işlemler

uygulandıktan sonra elde edilmiş saf bir üründür. PPD, DSÖ tarafından kullanımı kabul gören deri test maddesi olma özelliğiyle birlikte uygulanan kişinin aktif TB'si olup olmadığından çok MTBC basilleriyle karşılaşmış karşılaşmadığını gösteren bir testtir. Tamamen saflaştırılmaması ve diğer mikobakterilerle çapraz reaksiyon vermesi gibi dezavantajlara sahiptir [108,109].

Isı Şok Proteinleri HspX (65Kda, 38 Kda, 12 kDa): HspX [65Kda, 38 Kda, 12 kDa] gibi farklı çeşitleri olan bu proteinler Şaperon benzeridir. Konakta koruyucu immünite gelişmesini ve Th1 cevabının oluşturulmasını sağlar. Ayrıca dormant fazda TB basilinin hayatta kalmasını ve apoptozdan korunmasını sağlar [108].

65 kDa Protein: Isı şok proteinlerine benzer özellikler gösteren bu antijen, yüksek derecede immünojenik bir saflaştırılmış proteindir. Konak hücrede varlığı kazeifikasyon nekrozu ve otoimmün reaksiyonlara yol açar [110].

ESAT-6 (Early secretory antigenic target): RD1 bölgesinden kodlanan ESAT-6, INF γ salınımını ve T hücre üretimini indükler. Ayrıca yapılan çalışmalarda ESAT-6'nın memeli hücre zarlarının bileşenlerinden olan dimiristoilfosfatidilkolin ve kolesterol içeren lipozomların kararsızlaşmasına ve parçalanmasına neden olduğu belirtilmiştir [111,112]. ESAT-6 kaspaza bağımlı bir yol ile makrofajların apoptozisini de indükler [113].

19 kDa Lipoprotein: Hücre duvarı proteindir. IFN- γ 'ye cevap veren genlerin bir alt kümesinin transkripsiyonunu bloke ederek makrofajların IFN- γ 'ya tepkisini hafifletme potansiyeline sahiptir. 19 kDa lipoprotein, aynı zamanda, Toll like reseptör sinyalleri ile MHC sınıf I antijen işlemlerini de inhibe eder [114]. Tümör nekrozis faktör alfa [TNF- α] ve IL-12 sentezini azaltmaktadır [115].

2.5.2.Mikobakteriyel Lipidler

Trehaloz-6,6 Dimikolat (Kord Faktör): Kord faktörü olarak da bilinen bu virülans alternatif kompleman yolunu aktive eder. Konak hücre mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasara yol açar. Ayrıca polimorfnükleer lökosit göçünü engellemenin yanı sıra granülom oluşumunda da rol oynar [116].

Lipoarabinomannan: Lipoarabinomannan MTBC'nin hücre duvar yapısında bulunur. Konağın tirozin fosfatını etkinleştirir. Ölü basillerin fagositozu sırasında sfingozin kinaz etkinleşirse, LAM aracılığı ile tirozin fosfat uyarılarak sfingozin kinazın durdurulmasına sebep olur [117].

Fosfatidil İnozitol Mannozyd: Lipid yapıda olan fosfatidil inozitol mannozyd haptene özelliğine sahiptir. Çapraz koruyucu immünitede rolü olduğu düşünülür [117,118].

Sülfolipidler [Sülfatidler]: Makrofajlarda meydana gelen fagozom-lizozom füzyonunu engelleyen glikolipidlerin içeriğinde sülfür bulunur. Kord faktörünün toksik etkisini arttırarak basilleri lizozom enzimlerinden korur [117,118].

WaxD: Freud's adjuvanının etkisini arttıran, peptidoglikolipid yapısındadır [117].

Muramildipeptit: Tek başına etkisizdir. Trehaloz dimikolatla birleşince immün sistemi uyarır [117].

Fosfatidler: Epitel hücrelerini dev hücrelere dönüştürerek tüberkül oluşumuna yol açar [117].

2.5.3. Mikobakteriyel Enzimler

MTBC basili konak hücresinde çoğalma sırasında kendi metabolizmasının ihtiyaç duyduğu aminoasitler, karbonhidratlar, pürin-pirimidinler kofaktörleri ve esansiyel metabolitleri çoğaldığı ortamdan sağlar. Ayrıca basiller konak makrofajlarında oksidatif strese karşı korunmak üzere antioksidan enzimler üretirler. MTBC basillerinin ürettiği en önemli enzimler; isopropilmalat izomeraz (LeuD) , antranilat fosforibozil (TrpD), pyrolin-5- karboksilat redüktaz (ProC) ve 1-fosforibozil aminoimidazol-süksinokarboksamid sentaz (PurC) gibi aminoasit ve pirolin sentezinde rol oynayan enzimler; Nitrat redüktaz (NarG), katalaz-peroksidaz (KatG) , alkil hidroperoksid redüktaz (AhpC), demir ile güçlendirilmiş süperoksit dismutaz (SodA) ve Cu, Zn ile güçlendirilmiş süperoksit dismutaz (SodC) gibi solunum enzimleri ile metal transferazlar, izositrat liyaz (Icl) , lipaz/esteraz (LipF), açılCoA sentaz (FadD33) ve fosfolipaz C gibi lipid metabolizması ile ilişkili enzimlerdir [119].

2.5.4. Transkript Regülatörleri

Mikroorganizmanın bulunduğu ortamdaki şartları düzenleyen regülatörler, gen transkripsiyonunu regüle eder. Kalıcı değişimlere sebep olan bu genlerden sigma A housekeeping genlerin ekspresyonunu düzenler. Sigma F, insanda latent enfeksiyonların başında metabolizmayı bazal düzeye taşır. Sigma E dış ortamdaki dezenfektanların varlığını ya da ısı artışını algılayarak gen düzenlemeleri yapar. Sigma H'nın oksidatif strese cevap olarak ekspresyonu artar [120].

2.6. Bulaş Yolu ve İmmünopatogenez

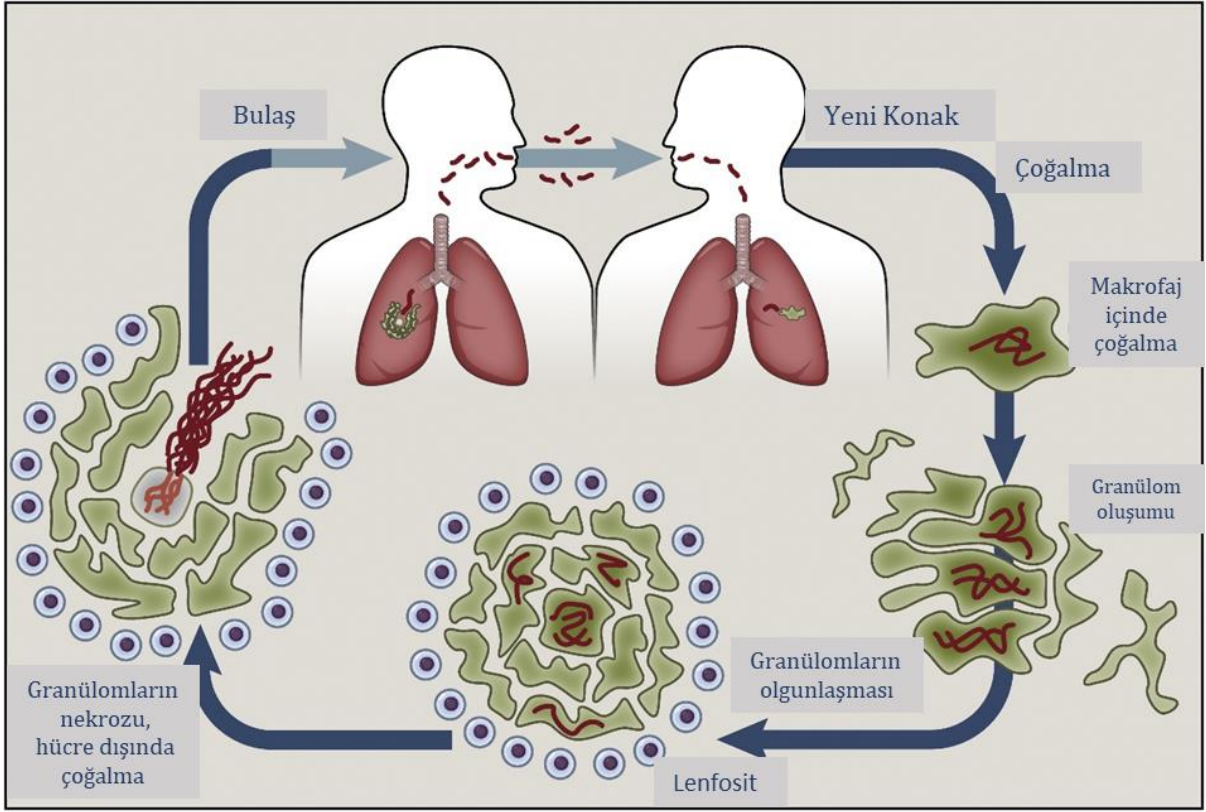
MTBC, TB'ye neden olan patojendir ve pulmoner TB hastaları en önemli enfeksiyon kaynağı olarak gösterilir [115]. DSÖ toplam dünya nüfusunun üçte birinin MTBC ile enfekte

olduğunu ve enfekte olmuş kişilerin%5-10'unun yaşamları boyunca aktif TB hastası olacağını tahmin edildiğini bildirmektedir [2]. Bir konak MTBC ile enfekte olduktan sonra aktif TB geliştirme olasılığı %10'dur [121].

TB'nin sağlıklı bireylere temel bulaş yolu MTBC basillerinin inhale edilmesidir. Öksürme, hapşırma gibi yollarla etrafa saçılan akciğer sekresyonlarının oluşturduğu damlacık partiküllerinin içerisinde dış ortama basiller salınır. Basil içeren damlacık partiküllerinin sağlıklı bireyler tarafından inhale edilmesiyle MTBC basillerinin konak ile etkileşimi başlamış olur [122]. MTBC basilleri akciğer dışı ve birden fazla organa yerleşebilir [121]. Basillerin yerleştiği organ farklı olsa da, meydana gelen patolojik olayların izlediği yol aynıdır. TB enfeksiyon riski, konak tarafından solunum yoluyla alınan basil yükü, konağın bağışıklık durumu ve bakteriyel virülans gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. TB'ye karşı konağın yanıtında hem doğal hem de kazanılan immünite rol alır [123].

2.6.1. Doğal İmmün Cevap

MTBC vücuda girdiğinde, hücre duvarının içerdiği metille zincirleriyle dallanmış yağ asitleri, bakteriyi konak enzimlerinden korur ve immün sistemin tepkilerden kaçmalarını sağlar [124]. Havada uzun süre asılı kalabilen, 1-5 µm büyüklüğündeki içerisinde basil içeren damlacık partikülleri solunum yolu bulaşında rol oynar (Şekil 2.4.) [3]. MTBC basilleri inhalasyonla konak vücuduna alındığında ilk önce doğal immün cevapla karşılaşır; siliyer mukoza hücreleri ile etkileşime geçen basiller yakalanarak dışarı atılır, yakalanamayan bir kısmı ise alveollere ulaşır. Alveollara ulaşan MTBC basillerinin virülans yeteneğine bağlı olarak yaklaşık %10 aktif TB geliştirme olasılığı vardır [125]. Enfekte olan kişilerde MTBC basillerinin çoğalmasını durduran enfeksiyondan genellikle 2-7 hafta içerisinde hücre aracılı immün yanıt oluşur. MTBC basillerinin nekroz doku içerisinde çoğalmasını ve yayılmasını sınırlayan granülomlar, makrofajları, T lenfositlerini ve diğer bağışıklık hücrelerini uyarır. Basillerin çoğu, oluşan granülomlarda yok edilir ve hastalık ilerlemesi durur [126]. MTBC basilleri makrofajlarla etkileşime girerek bir dizi immün yanıt başlatır. Basili fagosite eden makrofajın mikrobisidal yeteneği oldukça önemlidir. Mikobakterilerin makrofajlara invazyonu, makrofaj yüzeyinde bulunan kompleman reseptörleri, mannoz reseptörü, immünglobülin GFcy reseptörü gibi çeşitli makrofaj yüzey moleküllerine, basilin hücre duvarının penetrasyonu ile gerçekleşir. Makrofajda oluşan fagozumun içerisinde veziküler protonadenozin trifosfat toplanamaz ve asidifikasyon azalmaya başlar [4].



Şekil 2.4. MTBC'nin yaşam döngüsü [3].

MTBC hücre duvarı bileşeni olan LAM hücre içi Ca^{++} artışını inhibe ederek Ca^{++} /kalmudilin yolağına zarar vererek fagozom-lizozom füzyonunun gerçekleşmesini engeller ve böylece MTBC ortamda canlı kalır. Koronin 1 olarak bilinen protein, aktif basil içeren fagozomlara alınır ancak aktif olmayan mikobakteriler içeren fagozomlardan hızla salınır. MTBC, konakçı fagosit zarı üzerindeki koronin 1 salınımını artırarak lizozom oluşumunu inhibe eder; koronin 1 miktarı, mikrozomlardaki aktif MTBC'nin miktarı ve aktivitesi paralel ilişkilidir. MTBC basilleri alveolar makrofajlarda canlı kalmayı başarabilirse metabolizma hızını düşürür ve latent forma gelerek 25-32 saatte çoğalmaya başlar. MTBC'nin tanımlanmış bir endotoksini veya ekzotoksinin olmaması sebebiyle TB enfeksiyonuna karşı hemen konak yanıtı gelişmez. Konakta hücrel immün cevap gelişebilmesi için MTBC basillerinin belirli miktarda çoğalması gerekmektedir. MTBC basil makrofaj içinde çoğalarak makrofajı patlatır ve basiller serbest kalır [127].

Kaspaz kaskadı veya TLR'leri içeren bileşikler, makrofajların apoptozunu modüle eden mikobakteriyel bileşenler tarafından hedeflenir. Apoptozu inhibe eden *M. tuberculosis* bileşenleri arasında hücre duvarı bileşenleri, ManLAM, reaktif oksijen ara maddelerini kontrol etmek için süperoksit dismutazı (sodA tarafından kodlanmış) taşıyan NAH dehidrojenaz (nuoG ile kodlanmış), hücre duvarı bileşenleri, ManLAM, secA2 tarafından kodlanan virülansla ilgili salgı sistemi bulunur [128]. MTBC basilleri nekrotik hücre ölümüne neden olarak enfekte hücrelerden

kaçar ve makrofaj apoptozunu inhibe ederek konak savunmasını önler [129]. TB oluşumunda Th1 yanıtı Th2'ye dönüşür ve bu esnada oluşan kilo kaybı, ateş, doku hasarı gibi semptomlar Th1 yanıtı olan TNF- α 'nın sonucudur. Antijene spesifik T lenfositler TB enfeksiyonunun olduğu bölgeye toplanarak granülom lezyonlarının oluşumuyla doku hasarını başlatır [130].

2.6.2. Kazanılmış İmmün Cevap

2.6.2.1 Hümorale İmmün Cevap

TB enfeksiyonuna karşı antikorların varlığı, antikor bağımlı sitotoksosite, artmış antijen sunumu, opsonizasyon, kompleman aktivasyonu, sitokin cevabının arttırılması sayesinde MTBC basilinin mukozal yolla alınması önlenmektedir. Hücre içi patojen olan MTBC basilinin konak hücrelerinden eradike edilmesinde hümorale immün cevap tek başına yeterli olamamaktadır [130].

2.6.2.2 Hücresel İmmün Cevap

Sitokinler: IFN- γ ve TNF- α gibi T hücresi kaynaklı sitokinler, makrofajları aktive ederek ardından mikobakterisidal özellikteki nitrik oksit üretir [131]. MTBC basillerine karşı koruyucu bağışıklık tepkisinde IFN- γ , anahtar sitokin özelliğindedir [132]. IFN- γ T hücreleri, CD4 +, CD8 + ve NK hücreleri tarafından üretilir. TNF- α ve IFN- γ sinerjistik etkilidir. TNF- α ile sinerjistik etkileşime giren IFN- γ makrofajları aktive eder. Ayrıca IFN- γ , makrofajlarda 210'dan fazla genin transkripsiyonunu ve oksijen radikalleri gibi antimikrobiyal efektörlerin üretimini indükler. TNF- α mikrobisidal granülomların oluşumunu ve hücre göçünü başlatır. Enfekte olan makrofajlar tarafından üretilen TNF- α yanıtlarının bozulması, MCP-1 IL-8 ve Rantes gibi MTBC enfeksiyonlu bölgelere göçü sağlayan kemokinlerin sinyal veren ekspresyonunu indükler [133]. Makrofaj ve T hücrelerinden salınan TNF- α birlikteliği yeterli ve uzun süreli olarak MTBC enfeksiyonundan korunma için gereklidir. TNF- α aynı zamanda kemokin reseptörlerinin ekspresyonunu düzenleyerek kemokin salınımını da sağlar. Konak ile patojen arasındaki dengenin patojen lehine değişmesi genellikle TNF- α seviyesinin düşmesiyle artmaktadır [134]. IL-12 veya reseptörünün üretiminde kusurlu kişiler aktif TB hastalığına karşı oldukça hassastır [110]. IL-12'nin etkisi altında aktive halde bulunan CD4 + T hücreleri bol miktarda T hücresi türevli IFN- γ ve TNF- α üretir. MTBC enfeksiyonunda granümatözün başlaması ve lökositlerin ortama göçü proinflatuar sitokinler ve kemokinle gerçekleşir. IL-12 enfekte makrofajlardan salındığında, Th1 hücrelerinden salınan IL-10 ve IL-4'ün azalmasına neden olurken IFN- γ salınımını indükler [115].

CD4+ Hücreleri: CD4+ T hücreleri TB enfeksiyonunun her aşamasında önemlidir. Oluşan granülomlardaki enfeksiyonun kontrolünde rol oynayan CD4+ T hücreleri, makrofajlar veya dendritik hücreleri indükleyerek IL-10'un da içinde yer aldığı immünoregülatör sitokinlerinin üretilmesini sağlar. Fas/Fas ligand etkileşimi yoluyla enfekte makrofaj apoptozunun gerçekleşmesini ve bu esnada IL-2 ve TNF- α üretilmesini sağlar. IL-12 ve IL-15'in salınmasıyla makrofajların CD40 ligandı ile doğrudan temas yoluyla aktivasyonunu sağlar [135, 136]. CD4+ yardımcı T lenfositlerle olgun dendritik hücreler lenf düğümlerinde etkileşime geçtiğinde CD8+ sitotoksik T lenfositler de işlevsel hale gelir. MHC-II molekülleriyle antijen sunan dendritik hücre ve makrofaj gibi hücrelerin sunduğu antijeni tanıyan CD4+ yardımcı T lenfositler, IFN- γ gibi çeşitli sitokinler salgılayarak makrofajları aktive eder. Böylece aktif makrofajların içerdikleri basilleri öldürme yetenekleri artar. CD4+ T hücre sayısı HIV (+) enfeksiyonu esnasında azaldığından bu hastalarda TB gelişme riski yüksektir [137].

CD8+ T Hücreleri: CD8+ T hücreleri hem akut hem de kronik TB enfeksiyonunun kontrolünü kolaylaştıran hücrelerdir. MTBC ile enfekte makrofajlar için sitotoksik olabilen CD8+ T hücreleri IFN- γ gibi sitokinlerin üretilmesini sağlar. CD8+ T hücreleri, MTBC basillerini doğrudan granülisin yoluyla öldürebilme özelliğine sahiptir. Yapılan çalışmalarda MTBC basilleriyle enfekte olmuş bireylerde bu basillere özgü CD8 + T hücrelerinin varlığı bu hücre grubunun latent enfeksiyonun kontrolünde de rol oynadığını göstermektedir [138]. CD8+ T hücrelerinin sitokin üretimi ve enfekte hücrelerin lizisi ile bakteri ölümünü sağlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar M.tuberculosis'in doğrudan CD8+ T hücreleri ile öldüğünü göstermektedir [139]. Enfekte makrofajların apoptozisi, mikobakteriyel antijenler içeren apoptotik veziküller CD8 + T hücresi aktivasyonu için dendritik hücreler tarafından fagozom-kapalı antijenler dendritik hücreler tarafından alındığı için enfeksiyona karşı konak savunmaya katılmaktadır. M. tuberculosis ile enfekte olmuş hücrelerden apoptotik veziküller tarafından aktive edilen CD8+ T hücreleri IFN- γ üretir; bu durum, enfekte olmamış makrofajların, hücre içi M. tuberculosis'i etkin bir şekilde öldürmesi için RNI üretmesine neden olur. M. tuberculosis türevli birçok faktör, proapoptotik ve antiapoptotik genlerin diferansiyel ekspresyonu yoluyla enfekte makrofajların apoptozunu modüle etme (aktive etme ve inhibe etme) yeteneğine sahiptir [140].

2.7 Klinik Tablo

TB enfeksiyonu MTBC basillerinin neden olduğu ve genellikle akciğerleri (pulmoner TB) etkileyen, ancak diğer sistemlerde de (ekstrapulmoner TB) enfeksiyon oluşturabilen eski ve dünyadaki tüm önlenebilir yetişkin ölümlerinin dörtte birinden fazlasını oluşturan enfeksiyöz bir hastalıktır [2]. Pulmoner TB hastaları, akciğer sekresyonu içerisindeki basillerin öksürük ve

hapşırık gibi mekanik hareketlerle havada yayılmasını sağlar. Genel olarak, MTBC ile enfekte olmuş kişilerin %10'u TB hastalığını geçirirken, vakaların %90'ı da asemptomatik kalır [141]. MTBC basillerinin hayat döngülerini devam ettirebilme becerileri, aerosolle bulaşma döngüsünde konak bağışıklık sisteminin etkilerini önleyerek konakta kalıcılığını sürdürebilme yoluyla gerçekleştirebilmesidir [130].

Nüfus temelli çalışmalar, bazı bireylerin enfeksiyon kapma ve aktif hastalık geliştirme riskinin diğerlerinden daha fazla olduğunu göstermektedir. Aktif iletimin, TB görülme sıklığı yüksek olan ülkelerde, kalabalık yaşamın olduğu küçük hanelerde daha sık gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu sebeple TB vakalarının erken tespiti ve ÇİD-TB vakalarının doğru tanımlanması küresel TB kontrolünde önceliklidir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar düşük TB insidanslı ve yüksek TB insidanslı ülkelerde hastalık sunumunda ve popülasyon demografisinde belirgin farklılıklar olduğunu göstermiştir. MTBC bulaşının son birkaç yıl içerisinde daha artmış olan bazı Afrika ve Asya ülkelerinde, insidans oranı, enfeksiyon veya reinfeksiyonun daha fazla olmasından dolayı, genç erişkinlerde en yüksektir. Batı Avrupa ve Kuzey Amerika gibi TB insidansı düşük olan ülkelerde ise bu durumun aksine yaşlı popülasyon ve yüksek TB insidansı olan ülkelere gelen göçmenlerde insidansın yüksek olduğu görülmektedir [142]. TB enfeksiyonunun pulmoner formunun gelişimi (akciğerler bu bakterinin ana hedefidir) dört adıma bağlıdır: basilin fagositozu, basilin hücre içi çoğalması, enfeksiyonun gizli fazı ve aktif akciğer enfeksiyonu [143].

Bu adımlar spontan tedavi, hastalık, gizli enfeksiyon, yeniden aktivasyon veya yeniden enfeksiyon gibi farklı klinik senaryolara doğru ilerleyebilir. Bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler, özellikle AIDS'li hastalarda, MTBC ile enfekte olduktan sonra aktif TB gelişme riski daha fazladır. Bununla birlikte, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) / TB ko-enfeksiyonunun klinik sonucuna dahil olan kritik (konak veya patojenle ilgili) belirleyicilerin hiçbiri ayrıntılı olarak bilinmemektedir. MTBC doğal konağına yani insana çok iyi adapte olmuş hücre içi bir patojendir. Ana konaktaki hücre rezervuarı, mononükleer fagositlerdir (monositler ve makrofajlar) [144].

MTBC basilleri patojene özgü spesifik moleküler kalıplar (PAMP'ler) ile tanınarak alveolar makrofajlar tarafından yutulur. Basillerin fagositozunu takiben, enfekte olmuş makrofajlar, nötrofiller, monositler ve dendritik hücreler (DC'ler) dahil olmak üzere ek bağışıklık hücreleri pro-enflamatuar sitokinleri serbest bırakır. MTBC basillerini fagosite etmiş DC'ler akciğerden ayrılır ve adaptif immün yanıtın indüklenmesini sağlayan bölgesel lenf düğümlerine göç eder. Adaptif bir yanıtın başlatılması bakterileri çevreleyen bir granülom oluşumuna yol açar. Granülom yapıları, enfekte makrofajların, çok çekirdekli dev hücrelerin, epitelioid hücrelerin yanı sıra nötrofiller ve monositlerin merkezi bir bölgede toplanmasından oluşur. Fibrotik bir kapsülün gelişmesini sağlayan fibroblastların yanı sıra B hücreleri ve T hücreleri granülomun bir dış tabakasında yer alır. Bütün bu karmaşık olaylar dizisi, birincil adım olmadan, yani MTBC basillerinin mukozal ve doğal immün hücreler tarafından tanınması olmadan imkansızdır [145].

Primer Tüberküloz: MTBC alveollere ulaştığında karşılaştığı savunma mekanizmasında sağ kurtulursa akciğer parankiminde Ghon odağı oluşur. Bu noktaya yakın mesafedeki hiler lenf bezinde granümatöz inflamasyon meydana gelir. Bunun ardından Ghon odağı ile granümatöz inflamasyon arasında lenfanjit ile karakterize edilen Ranke kompleksi (primer kompleksin) meydana gelir. Bu süreç primer enfeksiyon olarak da isimlendirilir. Hücrel immün yanıtın bu oluşuma cevabı ile durdurulursa hastalık meydana gelmez. Eğer konağın immün yanıt cevabı yetersiz kalırsa Ghon odağı ve ilgili lenf bezinde oluşan granümatöz inflamasyon yayılarak primer TB meydana getirir. MTBC basilleri immün sistem hücreleri tarafından yok edilemeyip bu odaklarda yıllarca canlılığını koruyarak sessiz (dormant) kalırlar [146].

Miliyer Tüberküloz: Çocukluk döneminde özellikle 0-4 yaş arasındaki çocuklarda immün sistem zayıflığı nedeni ile primer enfeksiyonun komplikasyonu olarak görülebilir. Konakta gelişen primer enfeksiyonda oluşan kazeöz odaklardan birisinin damara açılması veya damarlara yerleşen basillerin erken hematogen yayılımı ile kana karışması miliar TB oluşturur [146].

Sekonder Tüberküloz: Konakta meydana gelen primer enfeksiyonun ardından latent formdaki basillerin aktif hale gelerek çoğalmaya başlamasıyla sekonder TB meydana gelir [146].

Ekstrapulmoner Tüberküloz: Enfeksiyonun akciğer dışındaki organlarda (plevra, perikard, kemik, böbrek, genital vb) meydana gelmesidir [146].

Endojen Reaktivasyon: Primer enfeksiyon sırasında oluşan Simon odaklarında latent halde kalan basillerin konak hayatının herhangi bir döneminde meydana gelen hücrel immün yanıtındaki supresyon sırasında aktif hale geçmeleri ile oluşur [146].

Ekzojen Reinfeksiyon: Hayatının bir döneminde primer enfeksiyon geçirmiş konağa, aktif tüberkülozlu basil yayan başka bir konağın yeniden virülen MTBC basili bulaştırmasıdır [146].

2.7.1. Tüberküloz Olgu Tanımları

Yeni Olgu: Daha önce TB tedavisi uygulanmamış veya bir aydan daha az süre tedavi görmüş hastadır [146].

Kronik Olgu: Nüks, tedaviyi terk ya da tedavi başarısızlığı nedeniyle uygulanan yeniden tedavi rejiminin sonunda hala ARB (+) olan hastadır [146].

Nüks (Relaps): Tedavi edilen ve kür edilen olgunun yeniden yayma pozitif olmasıdır [146].

Kür: Başlangıçta ARB (+) olan olgunun tedavisi devam ederken diğeri ise tedavinin tamamlandığı sırada olmak üzere en az iki kere ARB (-) olması halidir [146].

2.8. Tanı

Tüberküloz tanısı, doğrudan ve dolaylı yöntemler kullanılarak yapılabilir. TB'nin hızlı ve erken tanısı ile optimal tedavinin başlatılması, sadece bir hastanın doğru ve hızlı tedavi edilmesini sağlamanın yanı sıra gelecekteki TB vakalarının sayısının azalmasını da sağlayacaktır [99].

2.8.1. Dolaylı Tanı

2.8.1.1. Tüberkülin Cilt Test

Önceleri TB enfeksiyon tanısı, Mantoux intradermal reaksiyonu olarak da bilinen tüberkülin deri testi kullanılarak yapılmaktaydı. Tüberkülin deri testi, 100 yıldan uzun bir süre önce Robert Koch tarafından tanımlanan, 200 fazla antijen içeren MTBC'nin kültür süpernatantından elde edilen saflaştırılmış protein derivativesinin (PPD) intradermal olarak inoküle edilmesi sonucunda gelişen gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonunun ölçülmesi ilkesine dayanan deri testidir. Eğer kişi daha önce tüberküloz mikrobuyla karşılaşmışsa 2-3 gün içinde test yerinde bir kızarıklık ve sertlik şeklinde kabarıklık oluşur. Tüberkülin deri testi uygulandıktan genellikle 3 gün sonra oluşan sertlik, şeffaf bir cetvelle milimetrik olarak ölçülür ve kaydedilir. Bebeklerde veya bağışıklık sistemi baskılanmış vakalarda 5 mm çap ve yetişkinlerde 15 mm ve üzeri çap gözlemlendiğinde enfeksiyon belirtisi olabilir şeklinde yorumlanmalıdır. Tüberkülin deri testi düşük duyarlılığa sahiptir, patojen olmayan çevresel mikobakteri türleri ve BCG aşı suşunun ayrımında yetersizdir ve çapraz reaksiyon verir [147].

2.8.1.2. İnterferon-Gama Salınım Testleri (IGRA)

Bu testler, TB enfeksiyonu tanısında son yüzyıldaki en önemli gelişmelerden biri olarak görülmektedir. T-hücre temeline dayanan bu yöntem M. tuberculosis antijenlerine karşı in vitro interferon gama (IFN- γ) salınımının tepkisini ölçme mekanizmasıdır. Tam kan örneğinde, in vitro koşullarda, ESAT-6, CFP-10, TB7.7 gibi özgül antijenler ile uyarılan T-hücrelerce salınan IFN- γ düzeyinin ELISA yöntemi ile belirlenmesidir. Bu özgül antijenler, MTBC'de bulunan ancak BCG aşı suşunda ve çoğu TDM'de bulunmayan RD1 bölge genleriyle kodlanır [147].

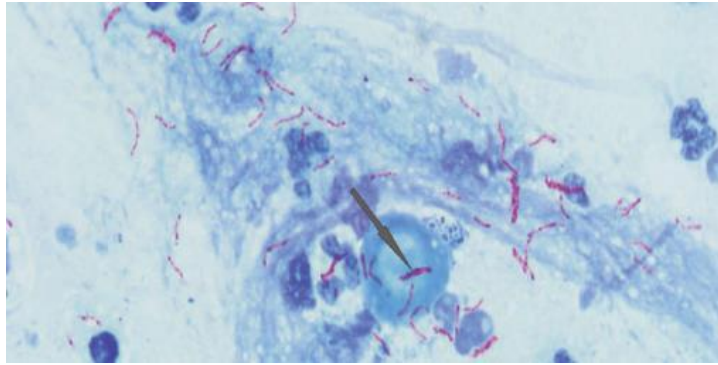
2.8.2. Doğrudan Tanı

Mikobakterilerin doğrudan tanısı; izolasyon, tür düzeyinde tanımlama ve izole edilen suşun ilaç duyarlılığının belirlenmesini içerir. TB tanısının uygun yöntemlerle yapılarak, incelenen örnekte MTBC basillerinin varlığı saptandığında ilaç duyarlılık testi de gerçekleştirilmelidir. Rutin kesin vaka tanısı taramalarında MTBC basilini bulabilmek için 3gün art arda balgam, açlık mide suyu, bronkoalveolar lavaj-bal, idrar, BOS, biyopsi, doku ve diğer

vücut sıvıları uygun besiyerine inoküle edilerek bu esnada hazırlanan boyamalarına da mikroskopik inceleme yapılır. MTBC tanısı için laboratuvara gönderilen örnekler konağın normal florasını da içerdiği ve örneklerin laboratuvara taşınması prosedürü başlıca bir kontaminasyon riski olduğundan dolayı, MTBC harici bakteri ve mantarları ortamdaki elemine etmek için dekontaminasyon işlemi uygulanır. Dekontaminasyon işlemi için sıkça kullanılan yöntemlerden birisi N-asetil-L-sistein %2 NaOH (NALC-NaOH) yöntemidir. Bu işlem sırasında NALC mukolitik etki gösterirken, NaOH ise dekontaminasyon sürecini gerçekleştirir [147].

2.8.2.1. Mikroskopik İnceleme

Dünyada en yaygın kullanılan TB tanısal testidir. Mikobakterileri mikroskopide görünür hale getirmek için aside dirençli basil (ARB) boyamasında iki yöntem kullanılır; karbol fuksin (EZN ve Kinyoun) veya florokromdur (auramin-rhodamin). EZN yöntemi boyanmasıyla yapılan mikroskopik inceleme en sık tercih edilendir. EZN boyama ile ARB aranması yaklaşık bir saat sürer, duyarlılık ve özgüllüğü de düşüktür. Ayrıca mikroskopide EZN ile boyanmış basil varlığı görüldüğünde MTBC ya da aside dirençli boyanan başka bir bakteri türü olup olmadığından tam olarak emin olamayız. Fakat bütün dünyada mikroskopik inceleme kolay, ucuz ve klinik şüphelye birlikte ayırım gücü yüksek olan bir yöntemdir (Şekil 2.5). MTBC basilleri hücre duvarlarının içerdiği yüksek miktardaki lipid sebebiyle hidrofobik özelliktedir. Basillerin boyanabilmesi için fenol gibi boyalarla ısı uygulanması ile muamele edilmesi gerekmektedir. Mikobakteriler renk giderme işlemi esnasında %3'lük asit alkole maruz bırakılır ve ortamdaki diğer mikroorganizmaların hücre yapıları içlerine hapsettikleri boyayı bu orandaki asit alkole bırakırken mikobakteriler bırakmaz. Metilen mavisi ise ortamda zıt boya olarak kullanılır. Değerlendirme yapılırken 300 mikroskop sahası taranır. Bu sahalarda mavi zemin üzerinde kırmızı boyanmış basil görülmezse negatif denmelidir. Alanlar taranırken 1-2 basil şüpheli, 10 alanda 1-9 basil görülmesi (+), 10 alanda 1-9 basil görülmesi (++) , her alanda 1-9 basil görülmesi (+++), her alanda 10 ve üzeri basil görülmesi (++++) olarak yorumlanmalıdır [148].



Şekil 2.5. Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle boyanmış MTBC basilleri [147].

2.8.2.2.Kültür

Tüberküloz tanısında altın standart bakteriyel yani kültür yöntemidir ve bu durum günümüzde hala devam etmektedir. Mikobakteriyel kültür yöntemleri katı besiyerleri ve sıvı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Katı besiyerleri agar ve yumurta bazlı olarak iki çeşittir. Günümüzde en yaygın kullanılan yumurta bazlı katı besiyeri, Löwenstein-Jensen (LJ)'dir. Petragani ve American Trudeau Society gibi katı besiyerleri az kullanılır. İçerisinde patates unu, gliserol, tuz, yumurta ile Mycobacterium ailesi için uygun üreme şartlarını sağlarken, besiyerine rengini de veren malaşit yeşili kontaminasyonu engellemektedir. Günümüzde en çok kullanılan agar bazlı yarı sentetik besiyerleri ise Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11'dir. Sıvı besiyerlerinin, Middlebrook 7H9, MGIT960, BACTEC900MB, MB/BacT ALERT 3D gibi ticari sistem çeşitleri bulunmaktadır. Sıvı besiyerleri tamamen şeffaftır ve bu nedenle MTBC kolonilerinin erken görülmesi tanıyı kolaylaştırır. Sıvı ortam, MTBC kültürünün izolasyonu için altın standart olarak kabul edilir ve önemli bir hıza (10 ila 14 gün arasında) ve katı ortamlarla karşılaştırıldığında daha iyi bir izolasyon kalitesine sahiptir.

MGIT960 sistemi modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bulunan tüplerden oluşur. Bu sistem temelde, tüpün tabanındaki silikona gömülü oksijene bileşik durumda olan floresan veren indikatör (fenetrolin rutenyum klorid pentahidrat), mikobakteri tüpteki oksijeni kullandığında bu indikatörün ışımaya yapmasına ve ışımının da cihaz tarafından otomatik olarak okunmasına dayalıdır.

BACTEC 9000 MB floresan temelli oksijen kullanımına duyarlı otomatize bir sistemdir. MB/BacT ALERT 3D besiyerinin tabanında kolorimetrik bir sensör içeren ve oluşan CO₂ seviyesine göre üreme değerlendirmesi yapan, besiyerlerinin sürekli kontrol altında tutulduğu tam otomatize bir sistemdir.

Standart katı bazlı kültür yöntemlerinin otomatik sistemler ile birlikte kullanılması esastır [148]. Örnek vermek gerekirse; 2010 yılında, DSÖ yeni, hızlı, otomatik, kartuş tabanlı bir nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT) olan Xpert® MTB / RIF testini (Cepheid, Sunnyvale, ABD) onaylayarak RIF direnci veya HIV ile ilişkili TB şüphesi olan bireylerde ilk tanı testi olarak kullanılmasını önermiştir [2].

2.8.2.3.Moleküler Tanı

Moleküler yöntemler MTBC DNA'sının kromozomal analizine dayanır. Farklı MTBC suşları arasındaki genetik ilişkiyi ölçmek için çok sayıda farklı moleküler yöntem geliştirilmiştir. Doğru moleküler identifikasyon, reinfeksiyonu reaktivasyondan ayırt edebilir, laboratuvar çapraz kontaminasyonunu tespit edebilir, suşların dağılımının coğrafi bölgelere göre karşılaştırılmasına izin verebilir ve TB evriminde bir görüş sağlayabilir. Ayrıca salgınların araştırılmasında ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanımı oldukça önemlidir [149]. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin fenotipe dayalı yöntemlerle birlikte kullanımı MTBC suşlarının kesin olarak birbirinden ayrılmasını sağlar. Ayrıca sağlık hizmetleri ortamlarında ve toplumda salgın araştırmaları gibi moleküler epidemiyolojik çalışmaları kolaylaştırır. Hastalığın ve daha virülen kabul edilen izolatların toplum içinde küresel ve yerel bulaş/yayılma dinamiklerinin ayrıntılarının daha iyi anlaşılması için kaynak olgulara ulaşmak oldukça önemlidir. Konvansiyonel temas takibi ile tespit edilmeyen epidemiyolojik bağlantıların oranı gibi bilgilere ulaşmamızı moleküler tiplendirme yöntemlerinin fenotipe dayalı yöntemlerle birlikte kullanımı sağlayabilir.

Moleküler tiplendirme sadece hastalığın epidemiyolojik yönlerini anlamamıza yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda MTBC genetik belirteçleri ile ilaca direnç potansiyeli, tedavi başarısızlığı gibi önemli klinik sonuçlarla ilişki kuran suş sınıflandırması ve hastaların klinik yönetiminde de faydalıdır. Moleküler teknikler, MTBC identifikasyonunda konvansiyonel yöntemlerden çok daha hızlı, yüksek derecede ayırt edici, gerçekleştirilmesi ve yorumlaması kolay yöntemler olduğu ve başarılı sonuçlar verdiği için günümüzde tercih sebebidir. Fakat bunların yanı sıra, pahalı ekipman ihtiyacını da yanında getirir [150,151].

2.8.2.3.1.Spoligotiplendirme

Goguet de la Salmoniere ve ark. [152] tarafından geliştirilen bu yöntem PZR bazlı ters dot blot hibridizasyon temeline dayalı tüberküloz için en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemidir. Kromozomal doğrudan-direkt tekrar (DR) lokusunda bulunan polimorfizmi göstermeye dayalı bir yöntemdir. Klinik laboratuvarlarda, moleküler epidemiyoloji, evrim ve popülasyon genetiği ile ilgili araştırmalarda kullanılan bu yöntem, MTBC genomunda IS6110 integrasyonunun sıcak noktasında 36 baz çiftlik direkt tekrar (DR) lokusları ve DR'lerin arasında 94 farklı düzenli kümelenmiş boşluklar arası kısa palindromik tekrarlar (CRISPR-Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) barındırır. Bu tekrar bölgelerinin 43 tanesi spoligotiplendirme yönteminde rutin laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda en sık kullanılan yöntemlerden birisi olan spoligotiplendirme düşük kopya sayısı

suşlarda ayırım gücü yüksektir. Bu yöntemle *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinipedii* ve *M. africanum* suşları kolayca tiplendirilebilmektedir [152].

M. tuberculosis genomu üzerinde DR dizilimini hedef alan biyotinle işaretlenmiş primerler kullanılarak DR'lerin arasındaki farklı ayırıcılar amplifiye edilmektedir. Membrana bağlanmış olan ve DR'lerin arasındaki spacer bölgelere komplementer olan 43 farklı oligonükleotid proba, amplifikasyon ürünü hibridizasyona sokulmaktadır. Dijital olarak kırk üç spacer diziliminin her birinin varlığı ve yokluğu kullanılarak rakamsal veriler elde edilmektedir [153]. Spoligotiplendirme yöntemiyle elde edilen oktal kodlar kullanılarak "http://www.pasteur.guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE" internet adresinden suşlara ait "Spoligotype International Type" (SIT) numaraları elde edilmektedir. SIT numaraları, SpolDB4 verileriyle karşılaştırılarak majör spoligofamilyaları (klad) belirlenir. Toplumdan izole edilen suşlarla, diğer ülkelerde dağılım gösteren majör familyalar ve SIT tipleri arasındaki filogenetik ilişki bu bilgilerle incelenebilmektedir [6].

2.8.2.3.2.MIRU-VNTR

Homojen ve stabil olan *M. tuberculosis* genomunda az sayıda sessiz mutasyon meydana gelmekte, genetik rekombinasyonlar, genellikle transpozonlar yoluyla veya tekrarlayan dizilerin polimorfizmi ile gerçekleşmektedir. En basit transpozon Insertion Sequence'dir (IS). MTBC genomu üzerinde 14'den fazla farklı IS elementi belirlenmiştir. IS ve tekrarlayan diziler farklı tür, dal ve alt dallarda farklı sayıda ve genomun farklı yerlerinde yerleşir ve genetik polimorfizmin oluşumunu sağladıkları kabul edilmektedir [154].

MTBC genomunda genler ve operonlar arasında dağılmış 10 - 100 baz çifti uzunluğunda minisatellit benzeri MIRU adı verilen tekrar lokusları bulunmaktadır. MTBC 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 temeline dayalı bu yöntemde, VNTR kopya sayısı polimorfizmi analizi MTBC soylarının genotiplendirilmesinde kullanılmaktadır [155]. MIRU-VNTR tiplendirme yönteminde ilk olarak 12 farklı lokusta bulunan MIRU'lar kullanılmış daha sonra 15 ve 24 lokusun ayırt edicilik güçleri üzerine araştırmalar yapılmıştır. 15 lokus içeren MIRU-VNTR protokolünün ayırt etme gücünün spoligotiplendirmeden üstün olduğu belirlenmiştir [156].

2.9. Tüberküloz Tedavisi

1944 yılında SM'nin tedaviye girmesiyle tüberkülozda modern kemoterapötik uygulama başlamıştır [157]. 1952 yılında INH'in keşfedilmesi ile PAS'ın birlikte kullanılması hastaların büyük bir çoğunluğunu tedavi etse bile tedavi süresi çok uzun sürmekteydi [158]. EMB'nin 1960'larda keşfedilmesinden sonra TB tedavisinde PAS'ın yerini EMB almış ve böylece tedavi süresi kısalmıştır. RIF'in etkinliğinin 1971 yılında bildirilmesi ile tedavi süresinin daha da kısaldığı bildirilmiştir. PZA'in hücre içi basil üzerindeki etkisinin gösterilmesi ile 1980'lerde altı aylık tedavi süresinin tüberküloz tedavisinde yeterli olduğu kabul edilmiştir. 1990'lı yıllarda AIDS'li tüberküloz hastalarının sayısının artması tedavi süresini, dokuz aya kadar ya da kültür negatife döndükten sonra altı ay daha tedaviye devam edilmesi şeklinde yeniden uzatmıştır [159].

Tüberküloz hastalarının tedaviye uyumsuz olabileceği ön kabulüne dayanan ve Doğrudan Gözetimli Tedavi (DGT) ismi verilen uygulama tüberküloz hastasının ilaçlarını bir gözetmen eşliğinde kullanması ve bunun kayda alınması şeklinde uygulanan bir tedavi yaklaşımıdır. Bu tedavi yaklaşımının amacı, tedavinin düzenli ve eksiksiz bitirilmesini sağlayarak tüberküloz insidansını azaltmak ve ilaç direnci gelişmesine engel olmaktır. Bu nedenle dünyada ve ülkemizde tüberküloz tedavisi için bir strateji olarak benimsenen DGT uygulaması ile ilgili veriler Sağlık Bakanlığı'nca aylık olarak toplanmakta, DGT uygulama süreci ise saha ziyaretleri ve telefon görüşmeleri ile aktif olarak takip edilmektedir [160].

2.9.1. Antimikobakteriyel İlaçlar

Antitüberküloz ilaçlarının ortak özellikleri hastalanmış konağın dokularında çoğalmakta olan basilleri hızla öldürmek ve hastalık bölgelerini sterilize ederek ilaca dirençli mutant suşların ortaya çıkmalarını önlemek şeklindedir [161]. DSÖ, anti-TB ilaçları, etkinliği ve kimyasal özellikleri gibi çeşitli kriterlere göre beş sınıfta gruplandırmıştır. Birinci sınıfa dahil edilen ilaçlar oral kullanılır ve EMB, INH, PZA ve RIF'dir. İkinci sınıfa dahil olan ilaçlar parenteral anti-TB ilaçlardır ve Amikasin, Kapreomisin, Viomisin, Kanamisin ve SM'dir. Üçüncü sınıfa dahil edilen ilaçlar Ofloksasin, Levofloksasin, Moksifloksasin, Gatifloksasin eski ve yeni kuşak florokinolonlardır. Dördüncü sınıfa dahil edilen ilaçlar oral bakteriyostatik 2. sıra ilaçlardır ve Sikloserin, Etionamid, Para-Amino salisilik Asit, Protionamid, Terizidon ile Tiasetazon'dur. Beşinci sınıfa dahil edilen ilaçlar ise etkinliği şüpheli ilaçlardır ve Amoksisilin/Klavulanat, Klaritromisin, Klofazimin, İmipenem, Linezolid, Bedakulin Delamanid'i kapsar [162].

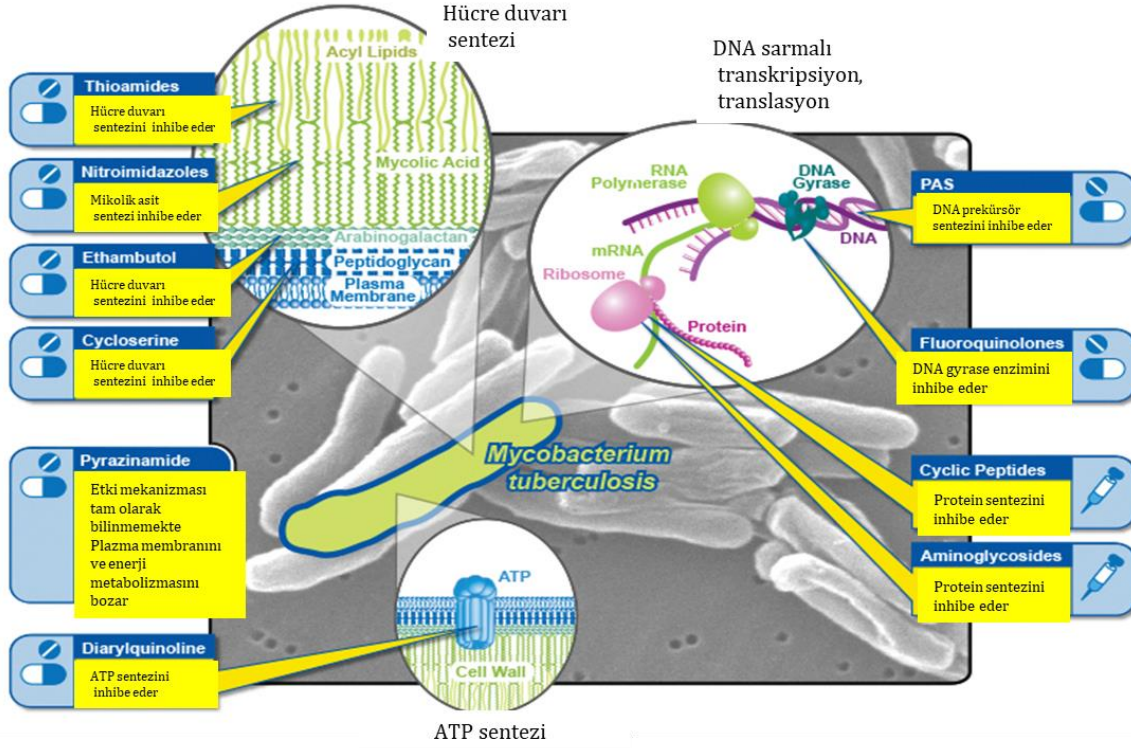
Günümüzde TB tedavisi, DSÖ'nün önerileri doğrultusunda birinci seçenek ilaçlar olan INH, RIF, PZA ve EMB'nin iki ay boyunca kullanılıp devamında dört ay INH ve RIF ile devam

tedavisi ile gerçekleştirilmesi şeklindedir. İlaça direnç gelişimi ya da intolerans gibi durumlar nedeniyle tedavi başarısız olursa genellikle daha toksik fakat daha düşük etkili olan PAS, Kapreomisin, Florokinolonlar, Kanamisin, Sikloserin ve Etionamid gibi ikinci seçenek antitüberküloz ilaçlar kullanılmaktadır [163].

2.9.1.1. Birinci Seçenek İlaçlar

Birinci seçenek ilaçlar içerisinde SM, INH, RIF (rifabutin, rifampin, rifampisin ve rifapentin), EMB ve PZA yer alır. İlaçların farklı etki mekanizmaları olduğundan kombine kullanılmaları etkilerini daha da arttırmaktadır. Hastanın tedavisi sırasında direnç gelişimi meydana gelmediği sürece bu ilaçların kullanımına devam edilmelidir (Şekil 2.6) [164].

Rifampisin: *Streptomyces mediterranei*'den elde edilen yarı sentetik rifamisin türevi bir antibiyotiktir. 1972'de antitüberküloz ajan olarak belirtildiği andan itibaren en etkili anti-TB antibiyotiklerinden birisi olarak TB tedavi rejiminde yer alır. Hem hızlı üreyen hem de yavaş üreyen basiller üzerinde etkilidir. Bakteri RNA sentez mekanizmasını inhibe ederek dormant ve latent basillere de etkilidir. Oral yolla alındıktan sonra 2 saatte maksimum serum konsantrasyonuna ulaşır. Enterohepatik siklusa girdiğinden etki etme süresi uzun bir ilaçtır. Karaciğerde deasetilizasyona uğrar, vücut sıvılarını kırmızıya boyar. En önemli yan etkisi hepatotoksisitedir [165] RIF dirençli MTBC kökenlerinin neredeyse %96'sında RNA polimeraz enziminin beta alt ünitesini kodlayan rpoB genin 507-533 kodonları arasındaki 81 baz çifti uzunluğundaki "rifampin resistance determining region (RRDR)" veya "hot spot" adı verilen bölgede "missense" mutasyonların, küçük delesyon veya insersiyonların olduğu gösterilmiştir [166]. Bunun sonucu olarak ilaca olan afiniteyi azaltan ve direnç gelişmesine neden olan konformasyonel değişiklikler meydana gelir. RIF mono direnci oldukça nadir görülür, hemen hemen tüm RIF dirençli suşlar diğer ilaçlara, özellikle de izoniazide karşı dirençlidir. Bu nedenle RIF direnci ÇİD-TB için bir süreklilik belirteci olarak görülür [167].



Şekil 2.6. Mevcut TB ilaçlarının etki mekanizmaları [164]

Streptomisin: Aslen toprak mikroorganizması olan *Streptomyces griseus*'tan izole edilen SM, Aminoglikozid antibiyotik grubu içerisinde yer alır. 1944'te keşfedilen SM, TB'ye karşı ilk etkili anti-TB ajan olmakla birlikte antimikobakteriyel ilaç direncinin ortaya çıkmasına sebep olan ilaçtır. SM'nin keşfiyle TB hastaları tedavinin ilk aylarında semptomlarını göstermemeye başlayarak sağaltım yaşadı, ancak hasta tedaviye devam ettikçe nöksler ortaya çıkmadı. Bu durumun SM dirençli MTBC suşları nedeniyle olduğu anlaşıldı. Sonuç olarak, SM başlayan monoterapi hızla ortadan kalktı ve tedaviye para-amino salisilik asit ilave edilerek ilk kombinasyon terapisi başlatılmış oldu [168]. SM protein sentezinde translasyonun başlamasını 16SrRNA'ya ve S12 proteinine etki ederek engeller. Yapılan çalışmalarda SM dirençli MTBC suşlarında iki tür mutasyonun varlığı tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar 16S rRNA'yı kodlayan rrs geninde oluşan mutasyon ile Ribozomal S12 proteinini kodlayan rpsL geninde oluşan nokta mutasyonudur [169].

İsoniazid: Nikotinamid'den sentezlenen INH ilk kez 1952 yılında TB karşıtı bir antibiyotik olarak bildirilmiştir. Etki mekanizması RNA ve DNA sentezini etkileme şeklindedir. Özellikle metabolik olarak aktif basiller üzerinde etkilidir. Bütün vücut sıvılarına geçer. Hepatotoksik etki gösterir ve ayrıca periferik nöropati yapar. İsoniazide direnç katG, inhA, ahpC, kasA ve NDH gibi çeşitli genlerdeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir. İsoniazid direncinin iki ana moleküler mekanizması, katG ve inhA veya promotör bölgesindeki gen mutasyonları ile ilişkilidir.

İnHA'daki mutasyonlar sadece izoniazid'e değil aynı zamanda aynı hedefi paylaşan yapısal olarak ilişkili ilaç olan Etiyonamidine de direnç sağlar [170]. INH, pasif difüzyonla hücreye girdikten sonra mikobakteriyel katalaz peroksidaz KatG tarafından aktivasyon gerektiren bir ön ilaçtır. KatG genindeki ilaç direnci mutasyonları, katalazın izoniazid ön ilacını aktive etme kabiliyetinin kaybı ile sonuçlanır. KatG mutasyonları yüksek seviyelerde INH direnci sağlayabilirken, inhA mutasyonu düşük seviyelerde izoniazid direnci ve etiyonamide çapraz direnç gösterebilir. İzoniazid mutasyonları en sık katG ve inhA genlerinde ortaya çıksa da, ndh, ahpC ve furA gibi genleri kodlayan diğer enzimlerde de görülür. Endemik ülkelerde daha yaygın TB'de, INH direncinin %31 ila %97'sindeki KatG mutasyonları (315 kodonunda) bulunmuştur [167].

Ethambutol: 1966 yılında ilk kez TB tedavisinde kullanılan, sentetik bir antibiyotik olan EMB günümüzde birinci basamakta yer alır. Ethambutol, hücre duvarında AG biyosentezini inhibe eder ve DNA sentezini yavaşlatarak basilin çoğalmasını durduran bir bakteriyostatiktir [171]. Yapılan çalışmalarda yaygın olarak görülen E direnç mekanizmasının embB gen mutasyonları ile embB306 konumundaki mutasyonlar ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ancak bazı çalışmalarda embB306'sında mutasyon tespit edilen suşların ethambutola duyarlı izolatlar olduğu görülmüştür [172].

Pirazinamid: TB tedavisinde 1950'lerin başında kullanılmaya başlanmış olan PZA, pirazin-2-karboksilik asidin amid türevidir. Aktif bileşeni olan pirazinoik asidi serbestleştirmek için amid grubunun ayrılması gerekir. Birinci basamak tedavinin bir parçasıdır ve kullanılmasıyla birlikte TB tedavisi süresini 6 aya indirmiştir. TB kazeifikasyon bölgelerinde asidik ortam içerisindeki uyur vaziyette olan basilleri baskılama özelliğine sahiptir [173]. PZA, pncA geni tarafından kodlanan pirazinamidaz/nikotinamidaz enzimi tarafından aktif formu olan pirazinoik asite dönüştürülen bir ön-ilaçtır [174]. Yapılan bir çalışmada ayrıca pirazinoik asit ve onun n-propil esterinin MTBC basiline yağ asidi sentezini baskılayabildiği gösterilmiştir [175]. PZA dirençli suşlarda PncA genindeki mutasyonlar oldukça yaygındır. Ancak bu mutasyonlar gen boyunca dağılmış olmakla birlikte en çok açık okuma çerçevesindeki 561-baz çifti bölgesinde veya onun varsayılan destekçisi olan 82-baz çifti alanında görülmektedir [176].

2.9.1.2 İkinci Seçenek İlaçlar

İkinci sıradaki ilaçlar arasında PAS, Sikloserin, Etiyonamid, Levofloksasin, Moksifloksasin, Amikasin, Ofloksasin, Siprofloksasin, Kanamisin ve Kapreomisin bulunur. Hastanın tedavisi sırasında primer ilaçlara gelişen bir direnç söz konusu olduğunda sekonder ilaçlar kullanılır. İkinci seçenek ilaçlar primer grupta yer alan ilaçlara göre daha az etkilidir ve ayrıca daha toksik, daha pahalı ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır [164].

Florokinolonlar: Florokinolonlar ÇİD-TB tedavisinde ikinci seçenek ilaç olarak kullanılmaktadır. Hem Siprofloksasin hem de Oflosaksin ana bileşiği olan nalidiksik asit olan sentetik türevli antibiyotiklerdir. Moksilosaksin ve Gatiflosaksin gibi yeni nesil kinolonlar klinik tedavilerde kullanılmaktadır. Florokinolonlar, bakteriyel canlılık için kritik 2 enzim olan topoizomeraz II (DNA giraz) ve topoizomeraz IV'ü baskılayacak şekilde çalışır. Bu proteinler sırasıyla gyrA, ghyrB, parC ve 37are genleri tarafından kodlanır. MTBC'de sadece Tip 2 topoizomeraz (DNA giraz) mevcut olup bundan dolayı florokinolon aktivesinin tek hedefidir. MTBC'de florokinolon direnci oluşmasının temel mekanizması, gyrA ve gyraB genlerinin kinolon direnci belirleyici bölgelerindeki kromozomal mutasyonlardır. Her ne kadar Gatiflosaksin ve Moksiflosaksin dirençli olup Oflosaksine duyarlı suşların varlığı rapor edilmiş olsa da florokinolonlar arasında çapraz direncin meydana geldiği varsayılmaktadır [177].

Kanamisin, Kapreomisin, Amikasin, Viomisin: ÇİD-TB tedavisinde kullanılan ikinci basamakta yer alan bu ilaçlar protein sentezini inhibe eder. Kanamisin ve Amikasin aminoglikosid türevi iken Kapreomisin ve Viomisin ise siklik peptid sınıfı antibiyotiklerdir. Kanamisin ve Amikasin protein sentezini 16S RNA seviyesinde değiştirerek inhibe eder. Kanamisine dirençli suşlarda en yaygın rastlanan mutasyon Rds geninin 1400 ve 1401. konumunda olup bu da Kanamisin ve Amikasin'e yüksek seviyede direnç göstergesi olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda aminoglikosid asetil transferaz kodlayan eis geninin destekleyici bölgelerinde görülen mutasyonlar ile düşük seviyede Kanamisin direnci ilişkilendirilmiştir. Kapreomisin ve Viomisin benzer yapıya sahip olup ribozoma bağlanır ve tam çapraz direnç gösterir. Ayrıca tlyA genindeki mutasyonlar Kapreomisin ve Viomisin direnci ile ilişkilendirilmiştir [177].

Etionamid: Etionamid (ETH), yapısal olarak izoniazide benzer bir izonikotinik asit türevidir ve TB tedavisinde ikinci basamak bir ilaçtır. Aynı zamanda, monooksijenaz EthA geni tarafından kodlanan ve aktivasyon gerektiren bir ön ilaçtır. Enoil-ACP redüktaz enzimini inhibe eden NAD ile bir eklenti oluşturarak mikolik asit sentezini inhibe eder. EthA, transkripsiyonel baskılayıcı EthR tarafından düzenlenir. EthR inhibisyonu, EthA'nın aşırı üretilmesine neden olur ve ETH'nin MTBC'ya karşı aktivitesini artırır. Etionamide direnç, etaA / ethA, ethR'deki mutasyonlar ve aynı zamanda hem Iszoniazid hem de Etionamid karşı direnç sağlayan inhA mutasyonları ile oluşur [178].

Para-Amino Salisilik Asit: Para-amino salisilik asit (PAS), TB hastalığının tedavisinde kullanılan ilk anti-TB ilaçlarından biri olmasına rağmen, ÇİD-TB tedavisinde ikinci basamak ilaç olarak kabul edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, PAS'a dirençli klinik izolatlarda da mevcut olan PAS'a dirençle ilişkili thyA genindeki mutasyonlar tanımlanmıştır [179].

Sikloserin: Sikloserin, ÇİD-TB tedavi rejimlerinde kullanılan ikinci seçenek anti-tüberküloz ve bakteriyostatik özellikte bir ilaçtır. D-alaninin bir analogudur; D-alaninin aktivitesini bloke ederek: D-alanin ligaz peptidoglikanın sentezini inhibe eder [180]. Yapılan bir

çalışmada bir D-alanin taşıyıcısını bloke eden cycA'daki bir nokta mutasyonunun, *M. bovis BCG*'deki sikloserin direncinden sorumlu olduğu da gösterilmiştir. [181].

Tiasetazol: MTBC mikolik asit sentezini inhibe ederek etki eder. Özellikle AIDS'li TB hastalarında toksiktir [182].

Makrolidler: TB tedavisinde makrolidlere karşı direnç, 23S RNA'da metilazı kodlayan emr37 geninin ifadesi olarak düşünülür [183].

Klofazimine: Klofazimin, bir riminofenazin bileşiğidir. Basillerin dış zarını hedef alır [184].

Linezolit: Linezolit bir oksazolidinondur. Linezolidin etki şekli, 50S ribozomal alt ünitesine bağlanan proteinlerin sentezindeki erken bir adımı inhibe etmesidir. Yapılan bir çalışmada ÇİD-TB suşlarının %1.9'unun linezolide dirençli olduğu bulunmuştur [185].

Bedaquiline: Daha önce TMC207 veya R207910 olarak bilinen Bedaquiline MTBC suşlarına karşı spesifik aktiviteye sahip olan diarilinolin sınıfına ait yeni bir antibiyotiktir. Bedaquilinin ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 2012 yılında onaylanması ve yaklaşık yarım yüzyılda TB tedavisi için geliştirilen ilk ilaç olması açısından umut verici gelişmelerdir. Bedaquilinin etki şekli, bir antimikobakteriyel ilaç için tamamen yeni bir etki hedefi olan *M. tuberculosis*'in ATP sentezini inhibe etmektir [186].

Delamanid: Daha önce OPC-67683 olarak bilinen Delamanid, mikolik asidin sentezini inhibe ederek etki gösterir, ancak izoniazitten farklı olarak, sadece metoksi ve keto-mikolik asidi inhibe ederken, izoniazid de a-mikolik asidi inhibe eder. DSÖ'nün 2019 tüberküloz raporunda, 2018 yılının sonlarına gelindiğinde 90 ülkenin Bedaquiline kullanmaya veya ithal etmeye başladığı, 57 ülkenin ise Delamanid kullandığını bildirmiştir [2].

2.9.2 Antimikobakteriyel İlaç Direnci

Çok ilaca direncin küresel olarak ortaya çıkarak yayılması postantibiyotik dönemi başlatarak TB'yi dünyanın birçok yerinde tedavi edilemez hale getirdi. Son 100 yıl boyunca, TB'nin 100 milyondan fazla insanı öldürdüğü düşünülmektedir. Dünya çapında büyük bir halk sağlığı sorunudur, çünkü dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri bu patojenin doğal rezervuarıdır [187]. Günümüzden 70 yıl önce, TB tedavisi için ilaç yoktu. 1950'lerde RIF ve 1960'larda İzoniazidin keşfedilen ilk antibiyotikler olmalarına ve mevcut antibiyotiklerin sayısı önemli ölçüde artmasına rağmen RIF ve INH halen TB tedavisinden birinci basamak grubundadır [2]. Ayrıca, ilaca duyarlılık testleri birçok ülkede, özellikle gelişmekte olan ülkelerde rutin olarak yapılmamaktadır. Kötü tedaviye uyum (eksik ya da kötü takip edilen tedavi) ile etkili ve hızlı teşhis araçlarının eksikliği, popülasyonlarda ilaca dirençli TB'nin ortaya çıkmasının ana faktörleridir [188].

Tek İlaça Dirençli Tüberküloz: Tek bir anti-TB ilaca dirençli *M.tuberculosis*'in neden olduğu hastalıktır. En sık görülen tek ilaca direnç durumu, INH veya SM'ye karşıdır [189].

Birden Çok İlaça Dirençli Tüberküloz: INH ve RIF'in her ikisini aynı anda içermeyecek şekilde, içinde en az iki birinci-basamak anti-TB ilacın bulunduğu ilaç kombinasyonlarına karşı gelişen direnç durumudur [189].

Çok İlaça Dirençli Tüberküloz: ÇİD-TB, *M.tuberculosis*'in diğer anti-TB ilaçlara dirençli olsun veya olmasın en azından günümüzde mevcut en güçlü birinci-basamak anti-TB ilaçlardan olan INH ve RIF'a karşı aynı anda direnç oluşturması durumudur [189].

Yaygın İlaça Dirençli Tüberküloz: YİD-TB, *M.tuberculosis* suşunun birinci-basamak anti-TB ilaçlardan en azından INH ve RIF'a (ÇİD-TB) ek olarak ikinci-basamak anti-TB ilaçlardan herhangi bir florokinolona (Ofloksasin, Siprofloksasin ve Levofloksasin gibi) ve parenteral kullanılan anti-TB ilaçlardan (Kanamisin, Kapreomisin ve Amikasin gibi) en azından birine karşı gelişen direnci ifade etmektedir [189].

Tüm İlaça Dirençli Tüberküloz: Duyarlılık testleri yapılabilen tüm birinci ve ikinci-basamak anti-TB ilaçlara dirençli TB olgularını tanımlamak için kullanılan tanımdır [190].

DSÖ TB sonlandırma stratejisi kapsamında ilaca duyarlılık testine (İDT) evrensel erişim çağrısında bulunmaktadır. Buradaki önem, bakteriyolojik olarak MTBC olduğu doğrulanmış ve klinik olarak uyumlu TB hastalarına İDT uygulanmasının ardından tedavi rejimi uygulanmasıdır [191]. TB'de tüm ilaç direnci formlarının erken tespiti, bu dirençli suşların yayılmasını azaltmak ve ihtiva etmek için kilit bir faktördür. DSÖ'nün küresel raporuna göre 2018 yılında, yeni vakaların %3.4'ünü ve önceden tedavi edilen vakaların % 18'ini ÇİD / RD-TB oluşturmaktadır. DSÖ 2019 raporuna göre 2018 yılında küresel olarak 186.722 yeni ÇİD/ RD-TB vakası tespit edilmiştir. Ayrıca yaklaşık olarak 214.000 vaka aynı yıl ölüm ile sonuçlanmıştır. Küresel ilaç direnci gösteren vakaların %50'sini Hindistan (%27), Çin (%14) ve Rusya (%9), oluşturmaktadır. Ayrıca RIF direnci olmadan izoniazid'e dirençli olan TB vakaları gün geçtikçe artmaktadır, 2002–2018 döneminde 156 ülkeden elde edilen verilere göre INH dirençli RIF duyarlı TB hastalarının oranının arttığı görülmüştür. Eş zamanlı RIF direnci olmayan global INH direnci ortalamaları yeni TB vakalarında %7.2 olarak bildirilmektedir [2]. Levofloksasin (florokinolon grubu) ve PZA, ÇİD / RD-TB ve INH dirençli, RIF duyarlı TB (Hr-TB) için tedavi rejimlerinin bileşenleri olarak dahil edilir. Hem RIF hem de INH açısından duyarlı olan hastalar arasında, levofloksasin veya PZA direnç prevalansı düşüktür. Bütün bu bilgilerin yanısıra bir istisna olarak Pakistan'da RIF ve INH duyarlı hastaların %9'unda Levofloksasin direnci bildirilmiştir. PZA veya Levofloksasine (veya her ikisine) direnç prevalansı, genellikle Hr-TB hastalarında, RIF ve INH duyarlı hastalardan daha yüksektir. Levofloksasin ve PZA karşı kombine direnç Hr-TB hastalarında nadir görülürken RD-TB hastalarında en yüksek görülmektedir. Hali hazırda mevcut olan sınırlı sayıda anti-TB ilacı ve tedavi için gerekli tedavi süresi göz önüne alındığında, aktif ve uykuda bulunan bakterilere karşı

hızlı sterilize edici aktiviteye sahip yeni ilaçların keşfedilmesi için küresel bir ihtiyaç vardır. Bu ilaçlar ideal olarak tedavi süresini kısaltmalı ve ilaç yükünü azaltmalıdır [192].

2.10 Epidemiyoloji

Yapılan çalışmalar, tarımın başlaması ve hayvan evcilleşmesinin gelişmesinden yaklaşık 70.000 yıl önce TB'nin ortaya çıkmış olabileceğini göstermiştir [193]. TB'nin varlığı, 500.000 yıllık bir *Homo erectus* fosilinde tipik kemik lezyonlarının varlığında tespit edilmiştir ve modern insana geçişinin buradan gerçekleştiği düşünülmektedir [194]. Yapılan çalışmalar, MTBC'nin hayvan kökenli değil, insan kökenli olduğunu öne sürmektedir [195]. Brosch ve ark. yaptıkları çalışmada *M. tuberculosis* ve *M. bovis* gibi ortak bir atayı paylaşabileceğini ve Neolitik dönem boyunca hayvan / bitki evcilleştirme sırasında insanlardan hayvanlara geçiş yapmış olmuş olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, Kolomb öncesi dönemin Peru'lu iskeletlerinden izole edilen *Mycobacterium* genomlarının analizi, deniz memelilerinin TB'nin okyanusun ötesine geçmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Yapılan araştırmalar, MTBC'nin Amerika kıtasına yüzgeçayaklılar yoluyla girme hipotezini destekliyor ve bu süreci bir insan konağına atlayışın ardından bölgeye yayılımın izlediğini olabileceğini göstermektedir [196]. Afrika, insana adapte olmuş MTBC soyunun tümünü ve dolayısıyla dünyadaki en büyük genetik çeşitliliği sunan tek bölgedir. Bu durum modern insanın durumuyla ilişkilendirildiğinde, Afrika'dan gelen *Homo sapiens*, modern insanların atası olarak kabul edilir ve en büyük genetik çeşitliliği barındırır. Yayılımla birlikte insanlara adapte olan MTBC, bazı insan popülasyonlarıyla daha spesifik olarak ilişkili olan soylara sahip filo-coğrafi bir popülasyon yapısını gösterir [197,198].

Epidemiyolojik veriler, MTBC'nin farklı filogenetik soylarının, farklı insan topluluklarına adapte olabileceğini düşündürse de, genel olarak filogenetik olarak 'modern' MTBC soyları, coğrafi yayılımı açısından 'eski' soylara göre daha başarılıdır. İnsan genetik çeşitliliği ile MTBC varyasyonu arasındaki etkileşimi ortaya koyan farklı MTBC soyları ile ilişkilendirilmiştir [199]. Yapılan çalışmaların verileri doğrultusunda MTBC'nin uzun zamandır insanlarla birlikte evrimleştiği ve dolayısıyla birbirlerinin evrimini karşılıklı olarak etkilediği açıktır. Comas ve ark. [63] yaptığı çalışmada insan ve MTBC soylarının mitokondriyal DNA'ları arasında yapılan çalışmada farklı soyların farklı insan topluluklarına özel olarak adapte olabileceğini göstermektedir. Spesifik insan genetik varyantları farklı MTBC soyları ile ilişkilendirilerek, insan ve MTBC arasındaki sıkı etkileşimleri açıkça ortaya koymaktadır. Bu özellik, insanlar arası bulaşın nadir ve sporadik olduğu uzun süre boyunca MTBC'nin hayatta kalmasına izin verebilecek bir konakçı patojen ko-adaptasyonunun sonucu olabilir. Bu özelliğin sonucu, insan popülasyonunun üçte birinin enfekte olmasına karşın TB'nin asemptomatik kalabilmesi ve bu durumda iken bu insanların bakteriler için mükemmel bir rezervuar olmasıdır. Bu sebeple, bütün ekosistemlerde

TB, en kırsal kesimden en kalabalık bölgelere doğru yayılabilir. Bu dualite MTBC'nin insanın demografik tarihine adaptasyonunun kanıtı olarak gösterilebilir [99].

2.10 1.Dünyada Tüberküloz

Küresel bir salgın olduğu halde düşük sosyoekonominin olduğu ülkeler TB'den daha fazla etiklenmekte ve vakalar genellikle ölümle sonuçlanmaktadır. Dünyanın her yerinde TB insidansı farklı boyutlardadır. DSÖ bu tüberküloz vakalarının yarıdan fazlasının (%56) Kuzey-Doğu Asya ve Batı Pasifik'te, dördte birinin Afrika'da olduğunu bildirmiştir. Nüfusa oranla en yüksek vaka ve ölüm oranları Afrika bölgesinde saptanmıştır. Hindistan ve Çin sırasıyla toplam vakaların %24 ve %11'inden sorumludur. Günümüzde ölümlerin en önemli sebeplerinden olan tüberküloz 2019 DSÖ verilerine göre geçen yıl 10 (9.0—11.1) milyon yeni TB vakası görülmüş ve 1.5 (1.4-1.6) milyon insan tüberküloz sebebiyle hayatını kaybetmiştir Yapılan çalışmaların verileri ışığında, diğer birçok bulaşıcı hastalıkta olduğu gibi, MTBC'nin insanla uzun süren etkileşimi ile, insan tüberkülozunun biyolojisi ve epidemiyolojisi şekillenmiştir. Dünyada tüberküloz hastalarının %80'inin bulunduğu 48 ülke, 'Yüksek Olgu Yüğü' olan ülkeler olarak adlandırılmaktadır [2].

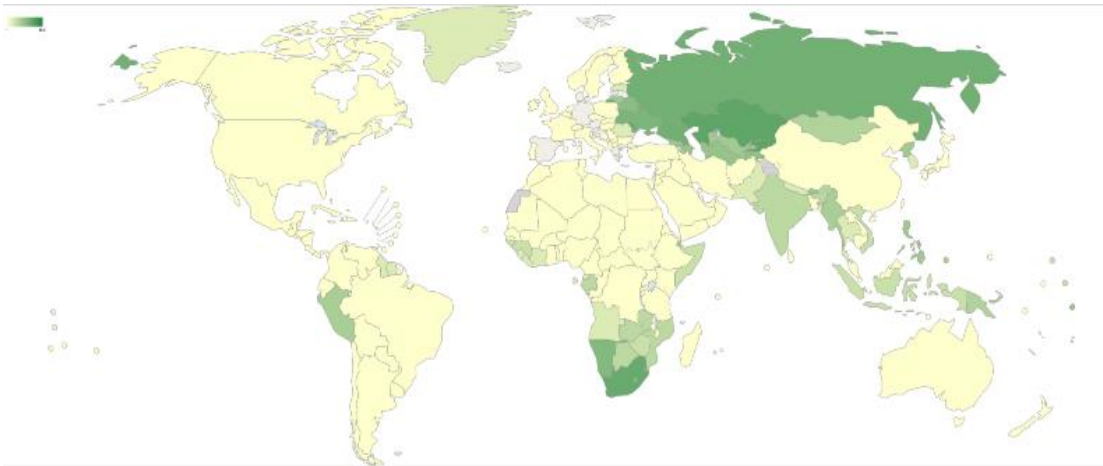
TB'nin hava yoluyla taşınması, yüksek nüfus yoğunluğu olan bölgelerde bulaşıcı olan bir hastalığın karakteristiğidir. Buna paralel olarak ise, birkaç on yıl boyunca insanlarda gizli kalma kapasitesi ise popülasyon yoğunluğu düşük bölgelerde bulaşan bir hastalık olduğunu göstermektedir [200]. 1980'lerin sonu ve 1990'ların başı boyunca sanayileşmiş ülkelerde bildirilen tüberküloz olgularının sayısında artış görülmüştür. Bu artış büyük oranda tüberküloz prevalansının yüksek olduğu ülkelere alınmış göç; HIV enfeksiyonu, şehirlerde artan sefalet, evsizlik, ilaç kullanımı gibi sosyal sorunlar ve tüberküloz hizmetlerinin kaldırılması ile ilişkilidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde etkili kontrol programlarının yürürlüğe sokulmasıyla birlikte 1993'de düşüş başladı. 1993'te DSÖ, 'Tüberkülozu Durdurmak İçin Küresel Plan' (Global Plan to Stop Tuberculosis) adlı projesi çerçevesinde 'Doğrudan Gözetim Altında Tedavi Stratejisi'ni (Directly Observed Therapy Strategy (DOTS)) uygulamaya geçirmiş, yayılan tüberkülozu kontrol altına almayı hedeflemiştir. TB'nin tekrar dünyanın gündemine girmesinde etkili olan en önemli faktör çok ilaca dirençli suşların oranındaki artıştır [201]. DSÖ raporunda 2018 yılında dünya çapında ÇİD-TB olgularının sayısı yaklaşık olarak 187 bin ve bunlar arasından %6,2'sinin yaygın ilaca dirençli TB olduğu bildirilmiştir (Şekil2.7) [2]. Saptanan ÇİD-TB olgularının yarıdan fazlası Çin, Hindistan ve Rusya'dadır. Dünyanın bazı bölgelerinde yüksek direnç oranları ve uygunsuz tedavi halen önemli endişe kaynağıdır [2].

Günümüzde 119 düşük ve orta gelirli ülkede (küresel ölçekte rapor edilen TB vakalarının %97'sini oluşturuyor) 2018 yılında finansal fonlama 6,9 milyar ABD dolarına ulaşmıştır. Önceki

yıllarda olduğu gibi, 2018'de mevcut olan finansmanın çoğu (%86) yerli kaynaklardan gelmektedir. TB önleme, teşhis ve tedavi hizmetlerinin sağlanmasına yönelik finansman 2006'dan bu yana iki kattan fazla artmıştır. Küresel çabalar, etkili tanı ve tedavi ile 2000 yılından günümüze kadar tahmini olarak 54 milyon hayat kurtarılmıştır. 2000 yılında hastalıktan ölen kişilerin oranı %23 iken, 2017 yılında bu oran %16'ya düşmüştür. Geçen yıl daha az insan hastalığa yakalanmış ve geçtiğimiz yıl tüberkülozdan (TB) daha az kişi ölmüştür. Ancak bunlar 2030'da TB'yi bitirmek için yeterli düzeyde değildir. 21. yüzyılda milyonlarca insanın bu önlenebilir ve iyileştirilebilir hastalıktan hayatlarını kaybetmesi hala kabul edilemez bir durumdur [2].

2.10 2.Türkiye'de Tüberküloz

Türkiye, TB insidansının orta düzeyde olduğu ülkeler arasında yer almaktadır [202,203]. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı'nca, Türkiye'de Verem Savaşı 2018 Raporu'na göre TB tahmini insidans hızı yüz binde 18 ve tahmini mortalite hızı yüz binde 0,62 olarak verilmiştir. Türkiye'nin, 2015 yılı yeni ve nüks olgularda tedavi başarısı %87 ve önceden tedavi görmüş olgularda tedavi başarısı %46'dır. ÇİD-TB açısından yüksek hastalık yüküne sahip 48 ülke arasında değildir. Küresel Tüberküloz 2017 Raporu ÇİD-TB haritalarında Türkiye'de yeni tüberküloz olgularında RD/ÇİD-TB oranı %0-2,9 aralığında, önceden tedavi görmüş tüberküloz olgularında RD/ÇİD-TB oranı ise %12-29 aralığında verilmektedir. 2016 yılında kayıtlara giren 12.417 TB olgusundan 8.704'üne (%70,1) HIV testi yapılmıştır. Yeni ve nüks olgularda test yapılan hasta sayısı 8.549'dur. Kayıtlara giren 12.417 TB olgusundan 60'ının (%0,48) HIV (+) olduğu tespit edilmiştir. DSÖ'nün son raporunda Türkiye'de 2018 yılında 13 (11-15) bin tüberküloz hastasının kayıtlı olduğu ve bunun yaklaşık %3.5'inin yeni vaka olduğu bildirilmiştir [204].



Şekil 2.7. DSÖ 2018 global bildirilmiş ÇİD-TB vakaları (her 100 000 popülasyonda). [2]

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.MTBC Suşları

Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ankara Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'na Ocak 2018-Mayıs 2019 tarihleri arasında 26 farklı ilden gönderilen, akciğer tüberkülozlu ve akciğer tüberküloz ön tanılı hastalara ait balgam örneklerden izole edilen 96 ÇİD MTBC izolatu çalışmaya dahil edildi. İzolatlar 15 lokus MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemlerinin kombinasyonu ile tiplendirildi.

3.2.İlaç Duyarlılık Testleri

3.2.1. MGIT 960 sistemleri ile antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi

MGIT 960 sistemleri için antibiyotik setinin hazırlanması: Liyofilize halde bulunan MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) SIRE (SM, INH, RIF, EMB) antibiyotik kiti içinde üretici firma (BD BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacteria Culture System, Becton Dickinson, Cockeysville, Md.) önerileri doğrultusunda 4 mL steril distile su ile sulandırılarak stok solüsyonlar hazırlandı. Her test için 5 adet MGIT tüpü üzerleri etiketlenerek kullanıldı. Her tüpe aseptik şartlarda 0,8 ml BACTEC MGIT 960 SIRE Supplement (Oleic acid, dextros, catalase, bovine albumin, polyoxethylene stearate) eklendi. Dört SIRE tüpünün her birine aseptik koşullar altında, firma önerileri doğrultusunda sulandırılmış liyofilize ilaç solüsyonlarından 100µL eklendi. Kontrol tüpüne antibiyotik eklemesi yapılmadı (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. BD BACTEC™ MGIT™ 960 MGIT tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları

İlaç	Liyofilize Antibiyotik İçeren Flakon	Sulandırım Sonrasında Konsantrasyon	MGIT Tüplerine Eklenmesi Gereken Volüm	Son Konsantrasyon
MGIT SM	332 µg	83 µg	100 µg	1.0 µg/ml
MGIT INH	33.2 µg	8.3 µg	100 µg	0.1 µg/ml
MGIT RIF	332 µg	83 µg	100 µg	1.0 µg/ml
MGIT EMB	1660 µg	415 µg	100 µg	5.0 µg/ml

İnokulum hazırlanması: Çalışmada inokulum hazırlarken üreme gerçekleşen pozitif MGIT tüpleri kullanıldı. Firma önerilerine göre bir MGIT tüpü, MGIT 960 cihazında pozitif olduktan sonraki gün (1.gün) dahil 3. güne kadar kullanılabilir. Bu bilgi doğrultusunda tüplerin pozitif olduğu gün 1-2 günü geçmemişse tüpler doğrudan iyice karıştırılıp, inokülasyon için kullanıldı. Eğer tüpler 3- 5 gündür pozitif ise serum fizyolojikle 1/5 dilüe edildi ve bu süspansiyon inokulum olarak kullanıldı.

İnokülasyon: Üzerleri etiketlenmiş dört ilaçlı MGIT tüpünün her birine (S, I, R, E) inokulum süspansiyonundan 0.5 mL eklendi. 1/100'lük kontrol süspansiyonu hazırlamak için 9.9 mL steril SF içine 0.1 mL mikroorganizma süspansiyonu eklenip iyice karıştırıldı. 1/100'lük kontrol süspansiyonundan kontrol olarak etiketlenmiş MGIT tüpüne 0.5 mL eklendi. MGIT 960 cihazına kayıtları yapıldı ve yerleştirildi.

Sonuçların yorumlanması: Her ilaçlı tüp ve kontrol tüpleri MGIT 960 cihazın üreme indeksi (GI) ile takip edildi. Testleri sonuçlanan örnekler dirençli ya da duyarlı olarak MGIT 960 cihazında izlenerek yorumlandı. Kontrol tüpünde 4 günden önce 400 GI üreme gözlenmesi kontaminasyon ya da inokulum fazlalığı şeklinde yorumlandı ve antibiyogram tekrar edildi. On üç günden sonra üreme gözlenmeyen (400 GI) kontrol tüpleri ise bakteri yoğunluğu yetersiz olarak değerlendirildi ve antibiyogram yeniden yapıldı.

3.3.Moleküler Test Aşamaları

3.3.1. DNA ekstraksiyonu

Spoligotiplendirme MIRU-VNTR yöntemlerinde kullanılmak üzere seçilen 96 MTBC izolatının DNA'sının elde edilmesi için MGIT sıvı ve Löwenstein-Jensen (LJ) katı besiyerinden alınan kolonilerin Mickle cihazı kullanılarak ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrası spektrofotometre (CHEBIOS) ile DNA ölçümü yapılarak yeterli ve eşit miktarda DNA bulunduğu kontrol edildi. Her bir izolattan elde edilen DNA ekstraktına spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR metodları uygulandı. Ekstraksiyon protokolü aşağıda belirtildiği şekildedir.

3.3.1.1.Sıvı besiyerinden DNA ekstraksiyonu

1. Üreme tespit edilen MGIT sıvı besiyerinden 0.5ml mikrosantrifüj tüpüne alındı.
2. 80°C'de 30 dakika inkübe edilerek bakteriler inaktive edildi.
3. 15000xG'de 15 dakika çevrildi, üst sıvı atıldı.
4. 0.5ml 1xTE buffer ilave edildi.
5. 15000xG'de 15 dakika çevrildi, üst sıvı atıldı.

6. 0.25ml 1xTE buffer ilave edildi.
7. Tüpe 50-100µl cam boncuk (SIGMA acid washed glass beads) ilave edildi.
8. 2 dakika Mickle (Mickle tissue disintegrator) cihazında hücre parçalama işlemine tabi tutuldu.
9. 15000xG'de 10 dakika çevrilerek, üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
10. -20°C'de çalışmalar gerçekleştirilinceye kadar saklandı.

3.3.1.2. Koloniden DNA ekstraksiyonu

1. Bir öze dolusu koloni 0.5ml 1xTE buffer içinde süspanse edildi.
2. Yukarıda yazılan prosedürün 2. basamağından devam edildi.

3.3.2. Spoligotiplendirme

Seçilen 96 MTBC izolatına ekstraksiyon sonrasında MAGPIX Milliplex Map cihazında spoligotiplendirme metodu uygulandı. Bu moleküler metodun PZR aşamasında 36 bp uzunluğunda DR bölgelerinin amplifikasyonu Beamadex Tüberküloz Spoligotiplendirme Kiti ile gerçekleştirildi.

3.3.2.1. PZR prosedürü

Spoligotiplendirme kiti içerisinde edinilen sarflar;

- ✓ Dra/Drl primerleri
- ✓ dNTP
- ✓ H37RV kontrol DNA
- ✓ M.bovis kontrol DNA

PZR protokolü gerçekleştirilmeden önce PZR için kullanılacak tüm malzemeler önce 20-30 saniye (en az 20 saniye olacak şekilde) vortekslendi. Tüm solüsyonlar PZR miksinde eklenmeden önce sırayla 5'er saniye vortekslendi.

PZR miks içeriği ve miktarları Tablo 3.2'deki gibidir. PZR miksi hazırlandıktan sonra mutlaka 30 saniye vortekslendikten sonra konikal tabanlı plate'e (0,2µl'lik RealTime PZR Plate) 23µl dağıtıldı. Ardından her DNA örneği 30 saniye vortekslenerek plate'e eklendi.

Thermal Cycler (Eppendorf Nexus) Protokolü;

95°C	3 dakika	} 20 siklus
95°C	1 dakika	
59°C	30 saniye	
72°C	15 saniye	
72°C	10 dakika	

3.3.2.2. Spoligotiplendirme metodunda kullanılacak çözeltilerin hazırlanması

5M TMAC

Toplamda 45ml 5M TMAC (Sigma) (Toz haldeki toplam hacmi 26 gr (MW: 109,6)) hazırlandı.

24,66 gr toz TMAC, 45 ml dH₂O ile çözülerek 50 ml'lik falkol tüplere 0,22 µm veya 0,45 µm filtreden geçirilerek porsiyonlandı. Solüsyon oda sıcaklığında (1 yıl maks.) saklandı.

1,5X TMAC

Tablo 3.3'te belirtildiği şekilde hazırlandı. Solüsyonlar hazırlanırken Sarkosyl presipite olmaması için en son eklendi. Hazırlandıktan sonra 0,22 µm veya 0,45 µm filtreden geçirildi.

1X TMAC

Tablo 3.4'te belirtildiği şekilde hazırlandı. Solüsyonlar hazırlanırken Sarkosyl presipite olmaması için en son eklendi. Hazırlandıktan sonra 0,22 µm veya 0,45 µm filtreden geçirildi.

TE

Tablo 3.5'te belirtildiği şekilde hazırlandı. Hazırlandıktan sonra 0,22 µm veya 0,45 µm filtreden geçirildi. 2 tüpe porsiyonlandı.

Tablo 3.2. Spoligotiplendirme PZR protokolü

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
5X Buffer (Promega)	5 µl
dNTP	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
Dra/Drl	2,5 µl
H ₂ O	11,25 µl
Taq enzim(5u/ul)	0,2 µl
DNA (10-20ng/ul)	2 µl
Toplam hacim	25µl

Tablo 3.3. 1,5X TMAC hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
5M TMAC	22,5 ml
%20'lik Sarkosyl	188 µl
Tris-HCl (1M, ph:8)	1875 µl
EDTA (0,5M, pH:8)	300 µl
H ₂ O	137 µl
Toplam Hacim	25 ml

Tablo 3.4. 1X TMAC hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
%20'lik Sarkosyl	125 µl
Tris-HCl (1M, ph:8)	1250 µl
EDTA (0,5M, pH:8)	200 µl
H ₂ O	8425 µl
Toplam Hacim	25 ml

Tablo 3.5. TE hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
Tris-HCl (1M, ph:8)	500 µl
EDTA (0,5M, pH:8)	100 µl
H ₂ O	49,400 ml
Toplam Hacim	50 ml

3.3.2.3. Hibridizasyon

Öncelikle kitin içerisinden çıkan TB-SPOL-MagPlex beadleri ultrasonik su banyosunda 30 saniye tutularak ardından 30 saniye vortekslendi. Bu işlem 2 kere tekrar edildi. Tablo 3.6'da belirtilen karışım hazırlandı ve 30 saniye vortekslendi. 2 ml eppendorf tüpüne aktarıldı. Hazırlanan karışım 96 konikal tabanlı plate'e kuyucuk başına 33 ul dağıtıldı.

Tablo 3.6. Hibridizasyon karışımı

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
TB-SPOL-Mag Plexbead	0,86 µl
TMAC 1,5X	32,14 µl

Ardından her kuyu içerisine Tablo 3.7'de belirtilen karışım en az 6 kere pipetaj yapılarak aktarıldı. Plate üstü seal ile kapatıldı. Thermal Cyclerda hibridizasyonun gerçekleşmesi için 98°C'de 10 dk. ve ardından 52°C'de 20 dk. bekletildi. Hibridizasyonun ardından plate 5000 RPM'de 10 dk. santrifüj edildi.

Plate santrifüj edildikten sonra manyetik plaka üzerine alındı. Manyetik plaka üzerinde her kuyucuk içerisinden 40 µl sıvı dikkatlice çekilerek atıldı. Bu işlem sırasında pipet tüpün dibine kadar değdirilerek ve yavaş bir şekilde hareket edildi. Plate manyetik plaka üzerinden alındı.

Tablo 3.7. Hibridizasyon karışımına PZR ürününün eklenmesi

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
PZR ürünü	2 µl
TE	15 µl

Bu işlemin ardından 2ml ependorf tüpe TMAC 1X 500 µl ve SAPE 2,5 µl koyularak 30 saniye vortekslendi. Meydana gelen karışımdan her bir kuyucuğa 25 µl eklenerek plate cihaza yüklenmeye hazır hale getirildi. Firma önerileri doğrultusunda Luminex X Potent isimli programda işlem gerçekleştirildi.

3.3.2.4. Cihaz verilerinin yorumlanması

Spoligotiplendirme metodu sonuçların yorumlanması aşamasında, cihazın verdiği blotlanma verileri analiz anahtarı uygulanarak SITVIT veri tabanı programına yüklenebilir hale getirildi. Sonuçlar Tablo 3.8’de belirtilen Oktal kodlama anahtarı kullanılarak 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan “Oktal kod” formatına çevrildi. Elde edilen veriler SITVIT veri tabanı kullanılarak kümeler ve kladlar belirlendi.

Söz konusu veri tabanına “http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/” adresinden ulaşılabilmektedir.

Tablo 3.8. Spoligotyping sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan Oktal kod anahtarı

□□=0	□■=3	■□=6	□ = 0
□□■=1	■□□=4	■□■ = 7	■ = 1
□■□=2	■□■=5		

3.3.3.MIRU-VNTR

Bu çalışmada 15 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanıldı. Hedeflenen MIRU lokusları için literatürde belirtilen primerler sentezletildi (Tablo 3.9.) [205].

3.3.3.1. MIRU-VNTR PZR

Her bir suşa özgü 15 MIRU lokusunun VNTR sayısının belirlenmesi için 15 PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR için reaksiyon karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

dH ₂ O	6,18 µl
DMSO (SIGMA)	1 µl
2X PZR Master mix(Thermo Science)	12,5 µl
Forward Primer	0,16 µl
Reverse Primer	0,16 µl
DNA	5 µl
Toplam hacim	25 µl

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

Thermal Cycler Protokolü

94°C 5dak.

95°C 30 sn.

62°C 60 sn.

72°C 90 sn.

72°C 10 dak.

+4 °C ∞

} 40 siklus

3.3.3.2.MIRU-VNTR PZR Ürününün Agaroz Jele Yüklenmesi, Elektroforezi ve Yorumlanması

Amplikonlar 150 Voltta, 180 dakika süre ile etidyum bromürlü %1 lik agaroz (SIGMA) jel elektrofrezine tabi tutuldu. Elektrofrez sonrası jel görüntüleme sistemi (VILBER Lourmant) ile görüntüledi. Bant büyüklüğünün tespitinde 50-1000 bp'lik marker (Fermantas) kullanıldı. Bant büyüklüklerine dayanarak 15 lokus MIRU-VNTR tipleme sonucunda her bir MIRU lokusunda bulunan allel tekrar sayıları MIRU-VNTR veri tabanı kullanılarak değerlendirildi (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU>).

Tablo 3.9.15 lokus MIRU-VNTR metodu için kullanılan primerler [209].

Alias	PCR primer (5'to 3')
Mtub04	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC (FAM)
ETRC	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
MIRU04	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM)
ETRD	GCGCAGCAGAAACGCCAGC
MIRU40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
MIRU10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
MIRU16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)
Mtub21	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA
QUB-11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)
ETRA	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGCATTT
Mtub30	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
MIRU26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)
MIRU31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA
ETRE	GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
Mtub39	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGAAAGCTTAG
QUB26	AACGCTCAGCTGTCCGAT (NED) CGGCCGTGCCGCCAGGTCTTCCCGAT
QUB4156	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (NED)

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 Hastaların Genel Özellikleri

Çalışmamızın amacı, spoligotipleme ve MIRU_VNTR yöntemlerinin MTBC identifikasyonu ve sürveyansındaki önemi ile, Ankara Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'na, Tüberküloz Laboratuvar Sürveyans Ağı'na üye olan merkezlerden ve çeşitli yataklı hastanelerden Haziran 2018-Mayıs 2019 tarihleri arasında akciğer tüberküloz ön tanılı veya şüpheli temas öyküsü olan hastalardan alınan balgam örneklerinden izole edilen 96 ÇİD-TB suşunun klonal ilişkisini belirlemektir. Çalışmaya dahil edilen 96 izolatin izole edildiği hasta grubunun 53 (%55.21)'si erkek, 43 (%44.79)'u kadın ve yaş ortalamaları 46,75'tir. Planlanan çalışma kapsamında her hastadan art arda 3 gün alınan balgam örneklerinden MTBC izole edilen bir örnek dikkate alınmıştır ve hastaların tedavi kapsamında kontrol amaçlı farklı tarihlerde gönderilen örnekleri tekrarı engellemek amacıyla değerlendirmeye alınmamıştır. İzole edilen MTBC suşları çok ilaca dirençli olarak bulunmuştur. Bu bağlamda en yüksek oranda ÇİD MTBC izolatinın, ikametgâh adresleri farklı olsa da İstanbul ilinden balgam örnekleri gönderilen hastalara ait olduğu görülmüştür.

4.1.2.Moleküler Tiplendirme Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen toplam 96 izolatin spoligotiplendirme metodu ile genotiplendirilmesi sonucunda, 93 izolatin (%96.88) 14 majör spoligofamilya (klad) kümesi içerisinde yer aldığı ve 1 suşun (%1.04) SITVIT2 (<http://www.pasteur.guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>) veri tabanındaki atipik suş olarak değerlendirildiği görülmüştür. 2 izolatin (SIT 1736 ve SIT 1196) (%2.08) ise herhangi bir klad içerisine dahil edilmediği bulunmuştur. Spoligotiplendirmedeki 93 izolat içinde en büyük majör spoligofamilya kümesinin 38 (%40.86) izolat ile T1 kümesi olduğu, bunu 16 (%17.20) izolat ile Beijing ailesi, 9 (%9.67) izolat ile LAM 9 ve 8 (%8.60) izolat ile LAM7 TUR ailesinin izlediği görülmüş olup 22 adet izolat (%23.66) ise Tablo- 4.1'de detayları verilen diğer alt kladlar altında kümelenmiştir. Bu çalışmada tanımlanan 16 Beijing suşunun 8'inin ikametgâh adresleri Türkiye olsa da Azeri kökenli hastalar oldukları, 5'inin İstanbul ikametgâhli olduğu, geri kalanların ise Sivas, Batman ve Isparta ikametgâhlarında yaşadıkları Tüberküloz Laboratuvar Sürveyans Ağı (TULSA) sistemi üzerinden öğrenilmiştir.

Değerlendirmeye aldığımız 93 izolat içerisinde T1 kladının 38 izolat ve %40.86 oranı ile en sık karşılaşılan majör spoligo ailesini oluşturduğu görülmüştür. SITVIT2 veri tabanında T1 ailesinin 17, 7, 3 suş içeren ve diğerleri 1'er suş içeren 14 farklı Spoligo Uluslararası Tip (SIT) gösterdiği bulunmuştur. Beijing ailesi ise 16 izolat ve %17.20 oranı ile SITVIT2 veri tabanında 10, 4 ve 1'er suştan oluşan 4 farklı SIT paterni gösterdiği bulunmuştur. 9 izolat ve %9.67 oranı ile LAM 9 ailesi 4 ve 1'er suştan oluşan 6 farklı SIT paterni gösterdiği bulunmuştur. 8 izolat ve %8.60 oranı ile LAM7 TUR ise 6 ve 1'er suştan oluşan 3 farklı SIT paterni oluşturduğu görülmüştür. Diğer izolatların majör spoligo aileleri ve SIT numaralarına göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir. 1 izolat SIT 1736 ve bir diğer izolat SIT 1196 altında kümelenmiştir ve SITVIT2 veri tabanında hiçbir kladın içerisine yerleştirilememiştir. SITVIT2 veri tabanına göre SIT 1736 suşu daha önceleri Bulgaristan, İtalya ve Amerika'da irdelenmiş, ülkemiz adına daha önce sistemde verisi bulunmamıştır. SIT 1196'da yine aynı şekilde ülkemizden herhangi bir verisi SITVIT2 veri tabanında bulunmamıştır. Daha önceki veriler Hindistan, Suudi Arabistan ve Amerika kaynaklıdır.

Çalışmaya dahil edilen izolatların spoligotiplendirme ve 15 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile değerlendirilmesi sonucunda izolatların spoligotip grupları içerisinde çok sayıda subgrup oluşturdukları görülmektedir. 15 lokus MIRU-VNTR ile yaptığımız klonal tiplerde MIRU-VNTR Plus (<https://www.miru-vnrplus.org/MIRU/searchdb.faces>) veri tabanlarında bulunan suşlarla karşılaştırma sonrasında suşların aynı lokus profiline sahip olmadığı, yani aynı klona ait olmadıkları çalışmada tespit edilmiştir. Küçük farklılıklarla benzer olanların ise aynı şehirde dahi yaşamadıkları görülmüştür. En fazla suş sayısına sahip T1 kladı 15 lokus MIRU-VNTR kombinasyonu ile üye sayıları 1-4 arasında değişen beş alt kümeye ayrılmış, 22 izolat ise özgün karakter göstermiştir (Tablo 4.2). İkinci büyük küme olan Beijing kladına ait 16 izolatın beşi MIRU-VNTR kombinasyonunda özgün profil sergilerken, kalan 11 suş üye sayıları 3-9 arasında değişen üç kümede toplanmıştır. Bu izolatların Türkiye vatandaşı olmayan (Azerbaycan ve Gürcistan vatandaşları) fakat ülkemizde sağlık kuruluşuna başvuran hastalar olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Ülkemize özgü olan LAM 7 TUR kladı ortak MIRU-VNTR kalıbına sahip değildir (Tablo 4.4).

Çalışmaya dahil edilen izolat örneklerinin hasta takibi yapılabildiği durumuyla, farklı kladlar ile birlikte ortak MIRU-VNTR kalıbına sahip olmamaları reenfeksiyona sahip hasta veya hastaların bulunmadığını ve çalıştığımız örnekler içerisinde bir klondan yayılımın söz konusu olmadığını gösteren değerli bir bulgudur.

Tablo 4.1: ÇİD-TB İzolatlarının Kümelenedikleri Spoligo Soy, Klad ve Sıt Kümeleri

MTBC Spoligo Soy, Klad ve Sıt Kümeleri		İzolat Sayısı		Toplamda Görülme Oranı (%)
		Kadın	Erkek	
Soy1				
EAI 5	SIT 2740	1	1	2.15
Soy 2				
Beijing	SIT 269	2	2	17.20
	SIT 1	4	6	
	SIT 255		1	
	SIT 2101	1		
Soy 3				
Cas1 Delhi	SIT 22		1	1.08
Soy 4				
T1	SIT 1105	1		40.86
	SIT 1318	1		
	SIT 1580	2	5	
	SIT 1761		1	
	SIT 1793	1		
	SIT 53	5	12	
	SIT 535	2	1	
	SIT 798	1		
	SIT 86	1		
	SIT 373		1	
	SIT 266		1	
	SIT 2513	1		
	SIT 2032	1		
	SIT 2541		1	
T2	SIT 1622	1		1.08
T5 Rus 1	SIT 254	3	3	6.45
LAM 2	SIT 1588		1	1.08
LAM 3	SIT 1280		1	1.08
LAM7 TUR	SIT 186	1		8.60
	SIT 41	1	5	
	SIT 367	1		
LAM9	SIT 161	1		9.67
	SIT 162	1		
	SIT 1800	1	3	
	SIT 2201	1		
	SIT 2648	1		
H1	SIT 42	1		2.15
	SIT 1165	1		
H3	SIT 47	1		5.37
	SIT 2211	1		
	SIT 335		1	
	SIT 35	1		
X2	SIT 36		1	1.08
	SIT 511		1	
	SIT 282	1		
Manu an	SIT 523	1	1	2.15

Tablo 4.2. Spoligotip T1 kladına ait izolatların SIT kümelerine göre 15 lokus MIRU-VNTR profili

Dahil Olduğu Klad	SIT Kümesi	Suş Sayısı	MIRU-VNTR	Oktal Kod
T1	SIT 1105	1	232534333322235	777773777760771
T1	SIT 1318	1	221314344522234	577767777760771
T1	SIT 1580	4	231535242522233	777777747760771
		3	232534334422233	
T1	SIT 1761	1	231433242522221	677767777760771
T1	SIT 1793	1	232532334422231	777777777760000
T1	SIT 53	2	231534242922225	777777777760771
		1	243527242623312	
		1	231421254824312	
		3	233531344422225	
		1	283643332732647	
		1	343433444934123	
		1	241531245324313	
		1	233531344422225	
		1	231534242522225	
		1	241132342731343	
		1	233531344422225	
		1	231534242522225	
T1	SIT 535	2	231534232522235	777777707760771
		1	234532231522233	
T1	SIT 798	1	232534333422233	437777777760771
T1	SIT 86	1	232534334422224	777777737760771
T1	SIT 373	1	232532243522233	777777767760771
T1	SIT 266	1	263643332732626	775740003760771
T1	SIT 2513	1	223533242822336	777767777760471
T1	SIT 2032	1	231534344522236	037627777760771
T1	SIT 2541	1	231434344522232	777740000760771

Tablo 4.3. Spoligotip Beijing kladına ait izolatların SIT kümelerine göre 15 lokus MIRU-VNTR profili

Dahil Olduğu Klad	SIT Kümesi	Suş Sayısı	MIRU-VNTR	Oktal Kod
Beijing	SIT 1	3	213753446824433	00000000003771
		5	233563426824533	
		1	321643446833443	
		1	232743444504543	
Beijing	SIT 269	3	321613445813542	00000000000771
		1	321742445803542	
Beijing	SIT 255	1	332843346731444	00000000003671
Beijing	SIT 2101	1	332642445712545	00000000003400

Tablo 4.4. Spoligotip LAM 7 TUR kladına ait izolatların SIT kümelerine göre 15 lokus MIRU VNTR profili

Dahil Olduğu Klad	SIT Kümesi	Suş Sayısı	MIRU-VNTR	Oktal Kod
LAM 7 TUR	SIT 186	1	0-0122342634342	777767404760771
LAM 7 TUR	SIT 41	6	223523132333333	777777404760771
			243722132333333	
			243522132333333	
			223444242433332	
			225445123432424	
LAM 7 TUR	SIT 367	1	243484224233233	773777404760771
			151132342734345	

4.2.Tartışma

Bütün dünyada tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen TB, 2018 yılında 10 milyon yeni vakaya sebep olmakla birlikte, 1.5 milyon ölümün meydana gelmesinden sorumlu bir hastalıktır. Yine 2018 verilerine göre dünya genelinde antimikobakteriyal ilaçlara dirençli 187 bin tüberküloz vakası meydana gelmiştir. Geçtiğimiz son üç dekatta global düzeyde yaşanan göçlerle beraber gelen sosyoekonomik sorunlar, bölgesel savaşlar veya iç karışıklıklar, özellikle de HIV/AIDS salgınının ortaya çıkmasıyla birlikte tüberküloz kontrol programlarının ihmal edilmesi gelişmiş birçok ülkede tüberküloz insidansında artışı meydana getirmiştir. Bunun yanı sıra DSÖ raporu, günümüzde epidemiyolojik sürveyansı baz alan kontrol programları sürdürülemediği için aktif tüberkülozlu hastaların %86'sının gelişmekte olan ülkelerde yaşamlarını sürdürdüğünü ve tüberküloza bağlı ölümlerin %95'inin de yine gelişmekte olan ülkelerde görüldüğünü bildirmektedir [2]. Bu nedenle TB'nin etkin tedavisi için doğru ve erken teşhis önemlidir. MTBC suşlarının epidemiyolojik döngüsü, farklı konak ve coğrafi dağılıma sahip olmasının yanı sıra farklı filogenetik soylara sahip olmasıyla da ilişkilidir. Tüberküloz tedavisinde neredeyse kötü yönetilmiş kontrol programları sonucunda ilaç direnci yaygınlaşmış ve bazı bölgelerde ortaya çıkan çok ilaç dirençli MTBC genotipleri, sınırlı nişlerinden çıkarak bütün dünyada önemli bir tehdit kaynağı oluşturmuştur. Bu durum tüberküloz kontrol programlarının yeniden önem kazanmasına yol açmıştır [205].

TB kontrol programlarının amacı, öncelikle TB tanısında duyarlılığının artırılmasıdır. Bunu takiben sağlık personeli gözetiminde tamamlanan tedavi ile MBTC suşlarının bölgeler ile ülkeler arası dolaşımın izlenmesini sağlamaktır. Bunu gerçekleştirebilmek için fenotipik karakterlere dayalı MBTC suşlarının ayırımının izlenmesi durumu, yerini genotipik özelliklere dayalı moleküler bazlı yöntemlere bırakmıştır. Moleküler tiplendirme yöntemleri TB kontrol programlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının olmasının yanı sıra bu koşullar yapılan çalışmanın spesifik koşullarına göre değişkenlik gösterebilir [206]. Global tehdit haline gelen tüberküloz salgınlarının önlenmesinde, hastalıktan korunmanın önemi ve yüksek duyarlılıkla erken tanı yöntemlerinin geliştirilmesi kadar, MTBC basillerinin bireylerden topluma geçiş hareketini izleyecek, bakterinin klonal düzeyde tanısına imkân sağlayacak tiplendirme yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bu yöntemler TB'nin epidemiyolojik sürveyansının temelini oluşturacaktır. MTBC izolatlarının moleküler epidemiyolojik farklılıkların belirlenmesinde MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemleri birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır [207].

MIRU-VNTR yöntemi PZR amplifikasyonuna dayalı bir genotiplendirme tekniğidir. Ayrım gücü yüksek olarak, kısa sürede kolay, hızlı sonuç veriyor olması ve tekrarlanabilirliği genotiplendirme yöntemi olarak epidemiyolojik çalışmalarda popülerliğini arttırmıştır. Bu

yöntemde farklı lokuslu gen bölgeleri (12 lokus, 15 lokus, 24 lokus) kullanılarak TB hastalarının, klinik izolatları arasındaki benzerlik ve farklılıklar belirlenir. MBTK izolatlarının soylarını ve kümeleri belirlemek için kullanılan spoligotiplendirme yöntemi, belirli bir kromozomal DR (direkt tekrar) bölgesindeki değişkenliği tespit eden PZR bazlı reverse dot blot yöntemidir. Bu yöntem kullanılarak basilin DR bölgesinde, 36 baz çifti ve 94 farklı spacer bölgesi belirlenmiştir. Fakat rutin çalışmalarda 43 tanesi kullanılmaktadır. MIRU-VNTR ve spoligotipleme gibi TB'nin karakterizasyonu ve genotipik analizini mümkün kılan araçların kullanımı, bir popülasyondaki MTBC varlığının dinamiklerini ve karmaşıklığını anlama olanağı sağlar [208].

DSÖ'nün 2019 tüberküloz raporunda [2] TB yükü yüksek 48 ülkeden biri olan ve Afrika boynuzunda yer alan Etiyopya'da Tulu ve Amenin [206] yayımladıkları derlemede, Etiyopya bölgesinde yapılan toplam 21 çalışmada spoligotiplendirmesi yapılan 3067 MTBC suşunun analizini yaptıklarında; Etiyopya bölgesinde MTBC soylarının görülme sıklığını sırasıyla Avrupa-Amerikan ailesi (Lineage 4) %64.8 oranında, Doğu Afrika-Hindistan-Orta Asya ailesi (Lineage 3) %23 oranında, Doğu Afrika-Filipinler-Hint Okyanusu ailesi (lineage 1) %7.1 oranında, Etiyopya ailesi (Lineage 7) %4.1 oranında ve Doğu Asya / Pekin ailesi (Lineage 2) %0.2 oranında olmak üzere beş spoligo majör ailenin varlığıyla tanımlamıştır. Tanımlanan majör ailelerin içerisinde görülen kladların görülme sıklığı sırasıyla %48 oranında T kladı, % 23 oranında CAS kladı, % 11 oranında H kladı, % 6 oranında MANU kladı ve % 4.1 oranında Etiyopya kladıdır. Ayrıca tanımlanan baskın SIT'ler her biri sırasıyla 420 izolat ile SIT149 (T3-ETH), 343 izolat ile SIT53 (T1), 266 izolat ile SIT25 (CAS-1 DELHİ), 162 izolat ile SIT37 (T3) ve 102 izolat ile SIT21 (CAS-1 KİLLİ)'dir [206]. Devi ve ark. [209] Hindistan'ın Assam eyaletinde 189 MTBC suşu ile gerçekleştirdikleri spoligotiplendirme çalışmasında, 43 orphan suşuna rastlanmış, 1 örnek ise (SIT1979) SITVITWEB tabanında herhangi bir klada dahil edilememiştir. Geri kalan örneklerin 18 farklı klad ve 89 ayrı SIT paterni oluşturduğunu ve toplam örnekler içerisinde 67'sinin (%35.45) Beijing kladına (SIT 1), 22'sinin (%11.64) CAS1-Delhi kladına ve 13'ünün (6.88) EAI5 kladına bağlı olduğu bildirmiştir. Yine aynı 189 MTBC suşunu 24-lokus MIRU-VNTR yöntemiyle çalıştıklarında ise 185 (%97.9) örneğin benzersiz olduğunu, fakat 4 izolatın 2 klad altında toplandığını belirtmiştir [209]. Munro-Rojas ve ark. [210] Veracruz Meksika'da 410 MBTC suşu içerisinden 125 ÇİD-MTBC suşu ile yaptıkları çalışmada 8 spoligo ailesi ve bu ailelerden en çok sırasıyla T1 kladı (24%), LAM kladı (16%), H kladı (15%) altında toplanan izolatlarla rastlamıştır. T1 kladı içerisinde 10 izolat SIT 53, LAM9 kladı içerisinde 10 izolat ile SIT42 ve 8 izolat ile H3 kladı içerisinde SIT50 en çok rastlanılan SIT'lerdir [210]. Yaptığımız çalışmada T1 kladı içerisinde en büyük kümeyi SIT53'ün oluşturması ile benzerlik gösterirken bizim çalışmamızda da LAM9 kladı içerisinde bir izolat SIT42 altında kümelenmiştir.

Farklı coğrafyalarda yapılan çalışmalarla bazı SIT'lerin ilaç direnciyle ilişkili olduğu görülmektedir. Yaptığımız çalışmada 96 ÇİD MTBC izolatını spoligotiplendirme yöntemi ile

irdelediğimizde 1 izolatın SITVIT sistemi tarafından özgün olarak değerlendirildiği görülmüştür. Bütün izolatlar içerisinde ikisi ise (SIT 1736 ve SIT 1196) yine SITVIT sistemi tarafından herhangi bir klad içerisine dahil edilemezken geriye kalan 93 suşun 14 klad içerisine dağıldığı bulunmuştur. Geriye kalan 93 ÇİD MTBC izolatından en büyük kümeyi 38 (%40.86) izolat ile T1 kladının oluşturduğu bir diğer büyük kümeyi 16 (%17.20) izolat ile Beijing kladının oluşturduğu görülmüştür. T1 kladının 14 farklı SIT oluşturduğu ve bu dağılımın 17 örnek ile SIT53, 7 örnek ile SIT 1580, 3 örnek ile SIT 535 olduğu bulunmuştur. T1 kladında görülen diğer 11 SIT (1105, 1318, 1761, 1793,798, 86, 373, 266, 2513, 2032, 2541) bir örnek ile temsil edilmiştir.

Coğrafi yayılımın kolaylığı açısından ülkemizin sınırlarına yakın bölgelerde yapılan çalışmalara baktığımızda; Nieman S. ve ark.[211] Gürcistan'da gerçekleştirdikleri çalışmada, spoligotiplendirme metodu ile 183 MTBC izolatını değerlendirmiştir. İzolatların %26'sının Beijing kladı, %18'inin LAM kasteri, %12'sinin Ural kladı ve %5'inin de Haarlem kladı altında kümelenildiği bildirilmiştir. Haeili ve ark. [205] İran'da 291 MTBC izolatıyla yaptıkları çalışmada izolatların 35 klad altında kümelenildiğini ve dominant kümenin Ural (%34.3) kladı olduğunu ve bu klad içerisinde en fazla SIT127 (15.8%) altında suşların kümelenildiğini bildirmiştir. Bunu takiben görülme fazlalığı sırasıyla CAS1 (24%) kladı ve bu klad içerisinde en fazla SIT 26 (%9.2) ve SIT25 (%4.4) altında suşların kümelenildiği, T1 (%18.2) kladında SIT53 (%6.1) ve SIT284 (%5.4) altında suşların kümelenildiği görülmüştür. Bu üç büyük kladı Manu2 (%7.5) ve LAM (%6.1) kladı izlemektedir. Çalışılan 291 MTBC izolatının 44'ü ÇİD suşları olduğu ve dirençli suşları Beijing kladı ile ilişkilendirirken Ural kladı içerisinde ÇİD suş bulunmadığı belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada bildirilen T kladı ve genellikle SIT53 altında kümelenen izolatların Irak-Türkiye sınırına yakın bölgede yaşayan hastalardan izole edildiği ve İran-İrak-Türkiye arasında yaşanan turizm, ticaret ve göç sebebiyle insan sirkülasyonuna araştırmacı tarafından dikkat çekilmiştir. Haeili ve ark.'nın [205] gerçekleştirdiği bu çalışmada T kladı açısından ulaştıkları bulguları destekleyen veriler, Türkiye, Türkiye sınır komşuları ve onlara komşu koridor hattı ile kıtalar arası mesafede dahi gerçekleştirilen çalışmada da gösterilmiştir. Dünya genelinde yapılan araştırmalara bakıldığında ilaca dirençli suşların, farklı profil ve farklı dağılımlara sahip soyların kladları tarafından domine edildiği görülmektedir. Çalışmaların genelinde T1 kladı içerisinde dirençli suşların en çok SIT53 altında kümelenmesi bizim çalışmamızla paralellik taşımaktadır [206,207,210]. Bununla birlikte, T kladı iyi bilinen filocoğrafik özelliklere sahip Haarlem, LAM, CAS ve EAI kladlarının aksine, yerleşik genotipik kladlarda sınıflandırılmayan suşları içermektedir. Bu kapsamda evrimsel anlamda karışık bir topluluğu temsil ettiği düşünülmektedir [212].

Gencer B., Shinnick TM. ve ark. [213] İran ve komşu coğrafyasında yaptıkları çalışmada İran ve Afgan tüberküloz hastalarından izole edilen 1742 MTBC suşunu spoligo yöntemi ile irdelediklerinde sırasıyla T, CAS, EAI ve LAM kladlarının baskın olduğunu bulmuştur.

Araştırmacılar verilerini Türkiye profili ile karşılaştırdıklarında, İran'da %32,3 ve Türkiye'de %36,5 oranları ile T kladı, Pakistan'da %61,3 ve Afganistan'da %27,4 oranları ile CAS kladlarının baskın olduğunu bildirmiştir. Pakistan ve Afganistan'da bulunan suşların çoğunluğunun atasal suşlara, Türkiye'de bulunanların modern TB suşlarına ait olduğunu, İran'da ise atasal ve modern TB suşlarının eşit oranda görüldüğü belirtilmiştir. Valcheva V. ve ark. [214] Bulgaristan'ın farklı bölgelerinden izole edilen 113 MTBC suşunu, Spoligotyping ve MIRU-VNTR metodu ile genotipik özellikleri yönünden değerlendirdiklerinde, spoligotiplendirme uygulaması sonucunda 2-29 suş içeren 15 küme elde etmiş ve 5 suşun tek üyeli özel küme oluşturduklarını görmüştür. T1 kladı ve altında kümelenmede SIT53 %25,7 oranıyla en fazla görülen aile, LAM7 TUR kladının ise altında kümelenen SIT41 %5,4 oranıyla ikinci sırada yer aldı bildirilmiştir. LAM7 TUR prevalansının dünya ortalamaları üzerinde bulunmasını Türkiye ile komşuluğuna bağlayan araştırmacılar, *M. tuberculosis* genotiplerinin yayılımında göçlerin önemine dikkat çekmiştir [214]. Zozio ve ark. [215] Malatya yöresi ve Ankara yöresinden izole edilen 245 MBTK izolatı ile gerçekleştirdikleri çalışmada dominant kladın LAM7 TUR (%21) ve içerisindeki en büyük kümeyi SIT41'in oluşturduğunu, ardından gelen kladın T1 (%16,3) ve içerisindeki en büyük kümeyi SIT53'ün oluşturduğunu ve diğer büyük kladın ise Haarlem (%5,3) kladı olduğunu bildirmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada 12 lokus MIRU-VNTR yöntemiyle Malatya yöresindeki suşlar arasında SIT41 kümesinde toplanan 19 izolatta aynı patern bulunmuştur [215]. Otlu ve ark. [216] sadece Malatya yöresinden izole edilen 67'si ilaca dirençli 220 MTBC izolatını spoligotiplendirme yöntemi ile irdelediklerinde, 112 izolat ile T kladı (%50,9) ve bu klad içerisinde 55 izolat ile SIT53 (%25), 26 izolat ile LAM7-TUR (%11,8) kladı ve bu klad içerisinde 19 izolat ile SIT41 (%8,6) ve 15 izolat ile SIT 284 (%6,8), 24 izolat ile Haarlem (%10,9) kladı en büyük üç kümeyi oluşturduğunu ardından ise sırasıyla 9,5 ve 3'er ve 1 izolat ile S, X, LAM9, Beijing, CAS1-Delhi kladlarının geldiğini bildirmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada majör ailenin T1 kladı ve içerisinde en büyük kümenin SIT53 olması ve LAM7-TUR kladı içerisinde en büyük kümenin SIT41 olması sebebiyle majör spoligo ailesi hariç diğer kladlarda farklılık görülse de bu çalışmalarla uyum göstermektedir. Tuzcu ve ark. [217] Çukurova bölgesinde bulunan mezbahalarda kesim sonrası granülatöz lezyon tespit edilen farklı 55 sığırdan alınan organ parçalarını kültüre ederek 55 adet MTBC izolatı elde etmiştir. Spoligotiplendirme yöntemi ile 55 izolattan 13 tanesinin *M.tuberculosis* suşu olduğu ve hepsinin T1 kladında (SIT53) kümeleniği belirtilmiştir. Bu çalışmada *M. tuberculosis*'in insanlardan hayvanlara, hayvanlardan da tekrar insanlara bulaşabileceği, insan ve hayvan kaynaklı TB vakalarının spoligotiplendirme gibi moleküler yöntemlerle araştırılarak epidemiyolojik olarak bulaş yollarının açıklanabileceğinden bahsedilmiştir. Durmaz ve ark. [218] tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Türkiye'nin dört değişik bölgesinden toplam 200 adet ilaca dirençli suşu incelediklerinde sırasıyla, LAM7-TUR kladı ve ST41 (%22,5) ile ST1261(%4,5) altında kümelenmiş, T kladı ve ST53 altında kümelenmiş

(%19.5), H3 kladı ve ST50 altında kümelenmiş (%6.5.), H1 kladı ve SIT 47 (%3.5) altında kümelenmiş izolatlar oldukları bulunmuştur. İlaça dirençli suşlar arasında *M. tuberculosis* gruplarının global dağılımı: LAM kladı (%33.5), T kladı (%29), Haarlem kladı (%14%) ve S kladı (%3) şeklindedir. LAM ve T kladları ile izolatların kümelendiği SIT53 kümesi bakımından çalışmamızla kısmen paralel bir çalışmadır. Zeytinli ve ark. [219] yaptığı çalışmada, Çukurova bölgesinde gerçekleştirdiği çalışmada 467 suş incelemeye alınmıştır. Spoligotiplendirme yöntemiyle 467 izolatın 443'ünün (%94.3) 21 küme içerisinde bulunduğu, 24'ünün (%5.1) ise SpolDB4 veri bankasındaki hiçbir küme içinde yer almadığı ortaya konulmuştur. Bölgede en yaygın görülen ailenin T1 kladı (%51.9), bunu LAM7 TUR kladının (%11.5) izlediği, Beijing (%1.3) kladına ait ÇİD izolatların sadece Şanlıurfa ilinden izole edilen suşlardan oluştuğu bildirilmiştir. Kısa ve ark.'larının [220] Ankara'da üç farklı merkezden izole edilen toplam 95 ilaca dirençli MTBC izolatını spligotiplendirme yöntemiyle inceledikleri çalışmada Haarlem (%24.2) kladı, T kladı (%23.2), LAM7-TUR kladı (%20), Beijing kladı (%6.3), LAM kladı(%5.3), Manu kaldı (%3.2) ve S kladı (%1) olarak saptanmıştır. Altı Beijing kladından dördü (%66.7) ÇİD suşlarda gözlemlenmiştir. Ülke genelinde yapılan birçok çalışmada Haarlem kladı genellikle majör aileyi oluşturmazken bu çalışmada T kladının önüne geçmiştir. Bizim çalışmamızda ise H1 kladından 2 (%2.08) izolat ve H3 kladından 5 (%4.16) izolat bulunmuştur. Kısa ve ark. [220], Haarlem kladında SIT47 baskınlığını ifade ederken bizim çalışmamızda yedi izolattan biri SIT47 kümesinde yer almıştır. Günel S. ve ark. [221] Malatya civarından izole ettikleri 450 MTBC suşunu değerlendirdikleri çalışmada T kladının %38,6 ile bölgede en sık karşılaşılan aile olduğunu bunu, %27,3 ile LAM7 TUR ve %14,8 oranı ile Haarlem kladlarına ait suşların izlediğini bildirmiştir. Bunu takiben dört izolatın Beijing kladından ve iki izolatın CAS1-Delhi kladından olduğu bildirilmiştir. Aynı coğrafik alanda birer yıl arayla Durmaz R. ve ark. [222] yaptıkları çalışmada 145 MTBC izolatının %23,9'unun LAM7-TUR kladı altında kümelendiğini ve bunu %22,5 oranı ile T1 kladına ait suşların izlediğini bildirmiştir. Bu çalışmanın Günel S. ve ark. [221] yaptığı çalışmadan sadece bir yıl arayla aynı coğrafyada yapılmasına karşılık bulgularının farklı olması suş popülasyonunda farklılıkların tespit edilmesi hem tüberküloz toplum etkileşiminin son derece değişken olduğunu göstermekte hem de moleküler epidemiyolojik çalışmalara duyulan ihtiyacın gerekçesini ortaya koymaktadır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen 96 ÇİD TB suşlarında dirençli suşlar arasındaki çapraz geçiş durumunun aydınlatılması ve filogenetik olarak dirençli kökenlerin analizinin ortaya konulması amacıyla gerçekleştirilmiş olan bu çalışmanın temel bulguları şunlardır.:

- T1 kladının 38 izolat ve %40.86 oranı ile en sık karşılaşılan majör spoligo ailesini oluşturduğu, SITVIT2 veri tabanında T1 ailesinin sırasıyla 17, 7 ve 3 suş içeren ve diğerleri 1'er suş içeren 14 farklı SIT gösterdiği bulunmuştur.
- Beijing ailesi ise 16 izolat ve %17.20 oranı ile SITVIT2 veritabanında 10, 4 ve 1'er suştan oluşan 4 farklı SIT paterni gösterdiği bulunmuştur.
- 9 izolat ve %9.67 oranı ile LAM 9 ailesi 4 ve 1'er suştan oluşan 6 farklı SIT paterni gösterdiği bulunmuştur.
- 8 izolat ve %8.60 oranı ile LAM7 TUR ise 6 ve 1'er suştan oluşan 3 farklı SIT paterni oluşturduğu görülmüştür.
- Bir izolat SIT1736 ve bir diğer izolat SIT1196 altında kümelenmiştir ve SITVIT2 veri tabanında hiçbir kladın içerisine yerleştirilememiştir.
- Bir izolat SITVIT2 veri tabanında atipik olarak bulunmuştur.

Ülkemizde farklı merkezlerden bildirilen bulgular çalışmamızla karşılaştırıldığında sıkça saptanan SIT'ler ve major kladlar açısından benzerlikler vardır. Ayrıca yapılan araştırmalarda bizimkiyle paralel olarak spoligotiplendirme sonucunda saptanmış olan yüksek kümeleşme oranının gerçek çapraz bulaşı ortaya koymada yetersiz olduğu, verilerin ayırım gücü daha yüksek olan MIRU-VNTR ile doğrulanması gerektiği ortaya çıkmaktadır. MIRU-VNTR ayırım gücünden faydalanabilmek amacıyla filogenetik çalışmalara örnek akışları sabit ve az olan bölgelerle başlanılmalı, klonal ilişkilendirme yapılabilecek olan suşların kümelendiği kladlar takip edilerek yeni üyeler tespit edilmelidir. Çalışmamızda öne çıkan spoligotiplendirme verilerine göre;

- Ülkemizde heterojen tüberküloz basil popülasyonu doğrulamış olduk.
- LAM7 kladı Anadolu'da yayılımı en fazla olduğu düşünülsede, T1 kladının yayılımda öne geçtiği ve ÇİD-TB suşları arasında Beijing kladından daha fazla görüldüğü bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- [1]. Gagneux, S. [2012]. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367[1590], 850-859.
- [2]. World Health Organization Global tuberculosis report 2019. WHO: Geneva, Switzerland, 2019. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- [3]. Cambier, C. J., Falkow, S., & Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 159(7), 1497-1509.
- [4]. Churchyard, G., Kim, P., Shah, N. S., Rustomjee, R., Gandhi, N., Mathema, B., ... & Cardenas, V. (2017). What we know about tuberculosis transmission: an overview. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl_6), S629-S635.
- [5]. Roetzer, A., Schuback, S., Diel, R., Gasau, F., Ubben, T., di Nauta, A., ... & Niemann, S. (2011). Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* typing methods in a 4-year study in Schleswig-Holstein, Northern Germany. *Journal of clinical microbiology*, 49(12), 4173-4178.
- [6]. Barbier, M., & Wirth, T. (2016). The evolutionary history, demography, and spread of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology spectrum*, 4(4).
- [7]. Gutierrez, M. C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., ... & Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 1(1), e5.
- [8]. Prasad, P. V. (2002). General medicine in Atharvaveda with special reference to Yaksma (consumption/tuberculosis). *Bull. Indian Inst. Hist. Med. Hyderabad*, 32, 1-14.
- [9]. Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., Besra, G. S., Lee, O. Y., Gernaey, A. M., ... & Bar-Gal, G. K. (2008). Detection and molecular characterization of 9000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. *PloS one*, 3(10), e3426.
- [10]. Baker, O., Lee, O. Y. C., Wu, H. H., Besra, G. S., Minnikin, D. E., Llewellyn, G., ... & Chamel, B. (2015). Human tuberculosis predates domestication in ancient Syria. *Tuberculosis*, 95, S4-S12.
- [11]. Chao, M. C., & Rubin, E. J. (2010). Letting sleeping dos lie: does dormancy play a role in tuberculosis?. *Annual review of microbiology*, 64, 293-311.
- [12]. Rittershaus, E. S., Baek, S. H., & Sasseti, C. M. (2013). The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell host & microbe*, 13(6), 643-651.
- [13]. Cosma, C. L., Sherman, D. R., & Ramakrishnan, L. (2003). The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 641-676.
- [14]. Feldman, W. H., & Baggenstoss, A. H. (1938). The residual infectivity of the primary complex of tuberculosis. *The American journal of pathology*, 14(4), 473.
- [15]. Paulson, T. (2013). Epidemiology: a mortal foe. *Nature* 502.
- [16]. Houben, R. M., & Dodd, P. J. (2016). The global burden of latent tuberculosis infection: a re-estimation using mathematical modelling. *PLoS medicine*, 13(10), e1002152.
- [17]. Tobin, D. M., Saelens, J. W., & Viswanathan, G. (2019). Mycobacterial Evolution Intersects With Host Tolerance. *Frontiers in Immunology*, 10, 528.
- [18]. Nguyen, L. (2016). Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Archives of toxicology*, 90(7), 1585-1604.
- [19]. Bloom, B. R., & Murray, C. J. (1992). Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*, 257(5073), 1055-1064.
- [20]. Barış, Y. İ. (2010). Dünyada Tüberküloz'un Tarihi. *Konuralp Tıp Dergisi*, 3(2), 1-4.
- [21]. Barış, İ. (2003). Çağlar boyu tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Ders notu. Samsun.
- [22]. Djelouadji, Z., Raoult, D., & Drancourt, M. (2011). Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemic bursts with a degrading genome. *The Lancet infectious diseases*, 11(8), 641-650.
- [23]. Özkalp, B., & Baysal, B. (2011). Tüberküloz şüpheli hastalardan *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolasyon oranı ve suşların BACTEC™ NAP ve immünokromatografik TB Ag MPT64 Rapid™ testleri ile tanımlanması. *Mikrobiyol Bul*, 45(2), 266-273.
- [24]. Zorluer, E., & Yaman, D. A. Yöremizde İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarında Direnç Profili.

- [25]. Palomino, J. C., Leão, S. C., & Ritacco, V. (2007). Tuberculosis 2007; from basic science to patient care.
- [26]. Yu, C. C., Chang, C. Y., Liu, C. E., Shih, L. F., Hsiao, J. H., & Chen, C. H. (2010). Drug resistance pattern of Mycobacterium tuberculosis complex at a medical center in central Taiwan, 2003–2007. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 43(4), 285-290.
- [27]. Torfs, E., Piller, T., Cos, P., & Cappoen, D. (2019). Opportunities for Overcoming Mycobacterium tuberculosis Drug Resistance: Emerging Mycobacterial Targets and Host-Directed Therapy. *International journal of molecular sciences*, 20(12), 2868.
- [28]. Ahmad, S. (2010). New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respiratory research*, 11(1), 169.
- [29]. Boshoff, H. I., Reed, M. B., Barry III, C. E., & Mizrahi, V. (2003). DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Cell*, 113(2), 183-193.
- [30]. Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., May, H., Lee, O. Y. C., Feldman, M., ... & Bar-Gal, G. K. (2015). Tuberculosis origin: the Neolithic scenario. *Tuberculosis*, 95, S122-S126.
- [31]. Sakula, A. (1982). Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax*, 37(4), 246-251.
- [32]. Velayati, A. A., Masjedi, M. R., Farnia, P., Tabarsi, P., Ghanavi, J., ZiaZarifi, A. H., & Hoffner, S. E. (2009). Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest*, 136(2), 420-425.
- [33]. Jajou, R., de Neeling, A., Rasmussen, E. M., Norman, A., Mulder, A., van Hunen, R., ... & van der Hoek, W. (2018). A predominant variable-number tandem-repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis isolates among asylum seekers in the Netherlands and Denmark, deciphered by whole-genome sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 56(2), e01100-17.
- [34]. Herrador, B. R. G., Rønning, K., Borgen, K., Mannsåker, T., & Dahle, U. R. (2015). Description of the largest cluster of tuberculosis notified in Norway 1997–2011: is the Norwegian tuberculosis control programme serving its purpose for high risk groups?. *BMC Public Health*, 15(1), 367.
- [35]. Lillebaek, T., Andersen, Å. B., Bauer, J., Dirksen, A., Glismann, S., de Haas, P., & Kok-Jensen, A. (2001). Risk of Mycobacterium tuberculosis transmission in a low-incidence country due to immigration from high-incidence areas. *Journal of clinical microbiology*, 39(3), 855-861.
- [36]. Lillebaek, T., Andersen, Å. B., Dirksen, A., Smith, E., Skovgaard, L. T., & Kok-Jensen, A. (2002). Persistent high incidence of tuberculosis in immigrants in a low-incidence country. *Emerging infectious diseases*, 8(7), 679.
- [37]. Albanna, A. S., Reed, M. B., Kotar, K. V., Fallow, A., McIntosh, F. A., Behr, M. A., & Menzies, D. (2011). Reduced transmissibility of East African Indian strains of Mycobacterium tuberculosis. *PloS one*, 6(9), e25075.
- [38]. Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., De Jong, B. C., Narayanan, S., ... & Hilty, M. (2006). Variable host–pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2869-2873.
- [39]. Reed, M. B., Pichler, V. K., McIntosh, F., Mattia, A., Fallow, A., Masala, S., ... & Schwartzman, K. (2009). Major Mycobacterium tuberculosis lineages associate with patient country of origin. *Journal of clinical microbiology*, 47(4), 1119-1128.
- [40]. Seber, E. (2010). Tüberkülozun dünü. *ANKEM Derg*, 24, 52-60.
- [41]. Umumi Hıfzısıhha Kanunu. <http://www.ttb.org.tr/mevzuat/index.umumhifzissihha-kanunu>.
- [42]. Çevirme, A. (2017). Dünyada ve Türkiye’de Tüberkülozun Önlenmesi ve Kontrolü ile İlgili Yasalar. *Türkiye Klinikleri Internal Medicine Nursing-Special Topics*, 3(1), 1-6.
- [43]. Coros, A., DeConno, E., & Derbyshire, K. M. (2008). IS6110, a Mycobacterium tuberculosis complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of Mycobacterium smegmatis, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. *Journal of bacteriology*, 190(9), 3408-3410.
- [44]. Veyrier, F. J., Dufort, A., & Behr, M. A. (2011). The rise and fall of the Mycobacterium tuberculosis genome. *Trends in microbiology*, 19(4), 156-161.

- [45]. Namouchi, A., Didelot, X., Schöck, U., Gicquel, B., & Rocha, E. P. (2012). After the bottleneck: Genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. *Genome research*, 22(4), 721-734.
- [46]. Rosas-Magallanes, V., Deschavanne, P., Quintana-Murci, L., Brosch, R., Gicquel, B., & Neyrolles, O. (2006). Horizontal transfer of a virulence operon to the ancestor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular biology and evolution*, 23(6), 1129-1135.
- [47]. Becq, J., Gutierrez, M. C., Rosas-Magallanes, V., Rauzier, J., Gicquel, B., Neyrolles, O., & Deschavanne, P. (2007). Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1861-1871.
- [48]. Jang, J., Becq, J., Gicquel, B., Deschavanne, P., & Neyrolles, O. (2008). Horizontally acquired genomic islands in the tubercle bacilli. *Trends in microbiology*, 16(7), 303-308.
- [49]. Costa, P., Botelho, A., Couto, I., Viveiros, M., & Inácio, J. (2014). Standing of nucleic acid testing strategies in veterinary diagnosis laboratories to uncover *Mycobacterium tuberculosis* complex members. *Frontiers in molecular biosciences*, 1, 16.
- [50]. Barış, İ. (1996). Son bilgiler ışığında tüberküloz. *İnfeksiyon bülteni*, 1, 23-29.
- [51]. Veyrier, F., Pletzer, D., Turenne, C., & Behr, M. A. (2009). Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC evolutionary biology*, 9(1), 196.
- [52]. van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M. J., Simeone, R., Brosch, R., & van Soolingen, D. (2012). Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging infectious diseases*, 18(4), 653.
- [53]. Stinear, T. P., Seemann, T., Harrison, P. F., Jenkin, G. A., Davies, J. K., Johnson, P. D., ... & Clarke, K. (2008). Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome research*, 18(5), 729-741.
- [54]. Wolschendorf, F., Ackart, D., Shrestha, T. B., Hascall-Dove, L., Nolan, S., Lamichhane, G., ... & Niederweis, M. (2011). Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4), 1621-1626.
- [55]. Borrell, S., & Gagneux, S. (2009). Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [State of the art]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(12), 1456-1466.
- [56]. Gedikoğlu, S. (1997). *Mycobacterium tuberculosis*' in hücre yapısı. Tümbay E.(ed), 1, 13-8.
- [57]. Çavuşoğlu, C. (2003). *Mycobacterium tuberculosis*' de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun, 367.
- [58]. Chakraborty, P., Kulkarni, S., Rajan, R., & Sainis, K. (2013). Drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from different genotypes exhibit differential host responses in THP-1 cells. *PloS one*, 8(5), e62966.
- [59]. Molle, V., & Kremer, L. (2010). Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Molecular microbiology*, 75(5), 1064-1077.
- [60]. Correia-Neves, M., Sundling, C., Cooper, A., & Källenius, G. (2019). Lipoarabinomannan in Active and Passive Protection Against Tuberculosis. *Frontiers in immunology*, 10.
- [61]. Meena, L. S. (2010). Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *The FEBS journal*, 277(11), 2416-2427.
- [62]. Hall, G. S., & Howard, B. J. (1994). *Mycobacteria*. Clinical and pathogenic microbiology. St. Louis, MO: Mosby-Year Book Inc, 503-528.
- [63]. Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K. E., Kato-Maeda, M., ... & Yeboah-Manu, D. (2013). Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature genetics*, 45(10), 1176.
- [64]. Clarke, C., Van Helden, P., Miller, M., & Parsons, S. (2016). Animal-adapted members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex endemic to the southern African subregion. *Journal of the South African Veterinary Association*, 87(1), 1-7.
- [65]. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., ... & Parsons, L. M. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 99(6), 3684-3689.

- [66]. Mostowy, S., Onipede, A., Gagneux, S., Niemann, S., Kremer, K., Desmond, E. P., ... & Behr, M. (2004). Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3594-3599.
- [67]. Stead, W. W., Eisenach, K. D., Cave, M. D., Beggs, M. L., Templeton, G. L., Thoen, C. O., & Bates, J. H. (1995). When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 151(4), 1267-1268.
- [68]. Brudey, K., Driscoll, J. R., Rigouts, L., Prodinger, W. M., Gori, A., Al-Hajj, S. A., ... & Binder, L. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology*, 6(1), 23.
- [69]. Boniotti, M. B., Goria, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., ... & Tagliabue, S. (2009). Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *Journal of clinical microbiology*, 47(3), 636-644.
- [70]. Bonard, D., Msellati, P., Rigouts, L., Combe, P., Coulibaly, D., Coulibaly, I. M., & Portaels, F. (2000). What is the meaning of repeated isolation of *Mycobacterium africanum*?. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4(12), 1176-1180.
- [71]. Haas, W. H., Bretzel, G., Amthor, B., Schilke, K., Krommes, G., Rüscher-Gerdes, S., ... & Bremer, H. J. (1997). Comparison of DNA fingerprint patterns of isolates of *Mycobacterium africanum* from east and west Africa. *Journal of clinical microbiology*, 35(3), 663-666.
- [72]. Viana-Niero, C., Gutierrez, C., Sola, C., Filliol, I., Boulahbal, F., Vincent, V., & Rastogi, N. (2001). Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *Journal of clinical microbiology*, 39(1), 57-65.
- [73]. Van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., De Haas, P. E., Hermans, P. W., Koedam, M. A., Teppema, K. S., ... & Schouls, L. M. (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1236-1245.
- [74]. Pfyffer, G. E., Auckenthaler, R., Van Embden, J. D., & van Soolingen, D. (1998). *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 631.
- [75]. Okafor, C. N., & Momodu, I. I. (2019). *Bacillus Calmette Guerin (BCG)*. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- [76]. Cousins, D. V., Williams, S. N., Reuter, R., Forshaw, D., Chadwick, B., Coughran, D., ... & Gales, N. (1993). Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. *Australian Veterinary Journal*, 70(3), 92-97.
- [77]. Cousins, D. V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., ... & Collins, D. M. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(5), 1305-1314.
- [78]. Thompson, P. J., Cousins, D. V., Gow, B. L., Collins, D. M., Williamson, B. H., & Dagnia, H. T. (1993). Seals, seal trainers, and mycobacterial infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 147(1), 164-167.
- [79]. Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelts, B., Van Soolingen, D., & Koeter, G. (2008). Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 12(12), 1469-1473.
- [80]. Emmanuel, F. X., Seagar, A. L., Doig, C., Rayner, A., Claxton, P., & Laurenson, I. (2007). Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerging infectious diseases*, 13(12), 1924.
- [81]. Erler, W., Martin, G., Sachse, K., Naumann, L., Kahlau, D., Beer, J., ... & Pavlik, I. (2004). Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from Central Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2234-2238.

- [82]. Pavlik, I., Dvorska, L., Bartos, M., Parmova, I., Melicharek, I., Jesenska, A., ... & Erler, W. (2002). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in the Czech Republic and Slovakia in the period 1965-2001 studied by spoligotyping. *Veterinarni Medicina-Praha-*, 47(7), 181-194.
- [83]. Sintchenko, V., Jelfs, P., Dally, M., Crichton, T., & Gilbert, G. L. (2006). A case of urinary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subspecies *caprae*. *Pathology*, 38(4), 376-378.
- [84]. Sahraoui, N., Müller, B., Guetarni, D., Boulahbal, F., Yala, D., Ouzrout, R., ... & Zinsstag, J. (2009). Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Veterinary Research*, 5(1), 4.
- [85]. Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J. C., Cousins, D., Ortega, A., ... & Domínguez, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(3), 1263-1273.
- [86]. Alexander, K. A., Laver, P. N., Michel, A. L., Williams, M., van Helden, P. D., Warren, R. M., & van Pittius, N. C. G. (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging infectious diseases*, 16(8), 1296.
- [87]. Dippenaar, A., Parsons, S. D. C., Sampson, S. L., Van Der Merwe, R. G., Drewe, J. A., Abdallah, A. M., ... & Warren, R. M. (2015). Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. *Tuberculosis*, 95(6), 682-688.
- [88]. Parsons, S. D., Drewe, J. A., van Pittius, N. C. G., Warren, R. M., & Van Helden, P. D. (2013). Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerging infectious diseases*, 19(12), 2004.
- [89]. Wagner, J. C., Buchanan, G., Bokkenheuser, V., & Levisseur, S. (1958). An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature*, 181(4604), 284-285.
- [90]. Marcos, L. A., Spitzer, E. D., Mahapatra, R., Ma, Y., Halse, T. A., Shea, J., ... & Escuyer, V. E. (2017). *Mycobacterium orygis* lymphadenitis in New York, USA. *Emerging infectious diseases*, 23(10), 1749.
- [91]. Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., ... & Simon, S. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7877-7882.
- [92]. Williams, M., Mizrahi, V., & Kana, B. D. (2014). Molybdenum cofactor: a key component of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis?. *Critical reviews in microbiology*, 40(1), 18-29.
- [93]. Ahmed, M. F. E. M. (2003). Detection Of Primary Drug Resistance Mutations *Mycobacterium Tuberculosis* In Khartoum State (Doctoral Dissertation, University Of Khartoum).
- [94]. Gandotra, S., Schnappinger, D., Monteleone, M., Hillen, W., & Ehrt, S. (2007). In vivo gene silencing identifies the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome as essential for the bacteria to persist in mice. *Nature medicine*, 13(12), 1515.
- [95]. Barber, T., & Sugar, A. M. (1994). *Mycobacteriosis* and nocardiosis in the immunocompromised host. In *Clinical approach to infection in the compromised host* (pp. 239-273). Springer, Boston, MA.
- [96]. Woolhouse, M. E., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., & Levin, B. R. (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature genetics*, 32(4), 569.
- [97]. Lipsitch, M., & Sousa, A. O. (2002). Historical intensity of natural selection for resistance to tuberculosis. *Genetics*, 161(4), 1599-1607.
- [98]. Young, D. B., Perkins, M. D., Duncan, K., & Barry, C. E. (2008). Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *The Journal of clinical investigation*, 118(4), 1255-1265.
- [99]. Banuls, A. L., Sanou, A., Van Anh, N. T., & Godreuil, S. (2015). *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of medical microbiology*, 64(11), 1261-1269.
- [100]. Straub, C. S., Ives, A. R., & Gratton, C. (2011). Evidence for a trade-off between host-range breadth and host-use efficiency in aphid parasitoids. *The American Naturalist*, 177(3), 389-395.

- [101]. Cowley, D., Govender, D., February, B., Wolfe, M., Steyn, L., Evans, J., ... & Nicol, M. P. (2008). Recent and rapid emergence of W-Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Cape Town, South Africa. *Clinical Infectious Diseases*, 47(10), 1252-1259.
- [102]. Reed, M. B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A. K., Kreiswirth, B. N., ... & Barry III, C. E. (2004). A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*, 431(7004), 84.
- [103]. Comas, I., & Gagneux, S. (2009). The past and future of tuberculosis research. *PLoS pathogens*, 5(10), e1000600.
- [104]. Comas, I., Chakravarti, J., Small, P. M., Galagan, J., Niemann, S., Kremer, K., ... & Gagneux, S. (2010). Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nature genetics*, 42(6), 498.
- [105]. Niemann, S., & Supply, P. (2014). Diversity and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: moving to whole-genome-based approaches. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(12), a021188.
- [106]. Singh, S., Kumar, M., & Singh, P. (2015). Evolution of *M. bovis* BCG vaccine: is niacin production still a valid biomarker?. *Tuberculosis research and treatment*, 2015.
- [107]. Yimer, S. A., Birhanu, A. G., Kalayou, S., Riaz, T., Zegeye, E. D., Beyene, G. T., ... & Tønjum, T. (2017). Comparative proteomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 7 and lineage 4 strains reveals differentially abundant proteins linked to slow growth and virulence. *Frontiers in microbiology*, 8, 795.
- [108]. Barry III, C. E. (2001). Interpreting cell wall 'virulence factors' of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology*, 9(5), 237-241.
- [109]. Lory, S. (2014). The Family *Mycobacteriaceae*. *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 571-575.
- [110]. Dubaniewicz, A. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins and autoimmunity in sarcoidosis. *Autoimmunity reviews*, 9(6), 419-424.
- [111]. Gao, L. Y., Guo, S., McLaughlin, B., Morisaki, H., Engel, J. N., & Brown, E. J. (2004). A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Molecular microbiology*, 53(6), 1677-1693.
- [112]. De Jonge, M. I., Pehau-Arnaudet, G., Fretz, M. M., Romain, F., Bottai, D., Brodin, P., ... & Cole, S. T. (2007). ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of bacteriology*, 189(16), 6028-6034.
- [113]. Derrick, S. C., & Morris, S. L. (2007). The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular microbiology*, 9(6), 1547-1555.
- [114]. Tobian, A. A., Potter, N. S., Ramachandra, L., Pai, R. K., Convery, M., Boom, W. H., & Harding, C. V. (2003). Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 171(3), 1413-1422.
- [115]. Ahmad, S. (2010). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011.
- [116]. Cardoso, F. L., Antas, P. R., Milagres, A. S., Geluk, A., Franken, K. L., Oliveira, E. B., ... & Ottenhoff, T. H. (2002). T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 in Brazilian tuberculosis patients. *Infection and immunity*, 70(12), 6707-6714.
- [117]. Astarie-Dequeker, C., Nigou, J., Passemar, C., & Guilhot, C. (2010). The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 7(1), e33-e41.
- [118]. Neyrolles, O., & Guilhot, C. (2011). Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis*, 91(3), 187-195.
- [119]. Dedieu, L., Serveau-Avesque, C., Kremer, L., & Canaan, S. (2013). Mycobacterial lipolytic enzymes: a gold mine for tuberculosis research. *Biochimie*, 95(1), 66-73.
- [120]. Rachman, H., Strong, M., Schaible, U., Schuchhardt, J., Hagens, K., Mollenkopf, H., ... & Kaufmann, S. H. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* gene expression profiling within the context of protein networks. *Microbes and infection*, 8(3), 747-757.

- [121]. Master, S. S., Rampini, S. K., Davis, A. S., Keller, C., Ehlers, S., Springer, B., ... & Deretic, V. (2008). Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell host & microbe*, 3(4), 224-232.
- [122]. Li, X. Z., & Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64(2), 159-204.
- [123]. Girard, M. P., Fruth, U., & Kieny, M. P. (2005). A review of vaccine research and development: tuberculosis. *Vaccine*, 23(50), 5725-5731.
- [124]. Rohini, K., & Srikumar, P. S. (2013). Insights from the docking and molecular dynamics simulation of the Phosphopantetheinyl transferase (PptT) structural model from Mycobacterium tuberculosis. *Bioinformation*, 9(13), 685.
- [125]. Zuniga, E. S., Early, J., & Parish, T. (2015). The future for early-stage tuberculosis drug discovery. *Future microbiology*, 10(2), 217-229.
- [126]. Hingley-Wilson, S. M., Sambandamurthy, V. K., & Jacobs Jr, W. R. (2003). Survival perspectives from the world's most successful pathogen, Mycobacterium tuberculosis. *Nature immunology*, 4(10), 949.
- [127]. Zhai, W., Wu, F., Zhang, Y., Fu, Y., & Liu, Z. (2019). The immune escape mechanisms of Mycobacterium tuberculosis. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 340.
- [128]. Hinchey, J., Lee, S., Jeon, B. Y., Basaraba, R. J., Venkataswamy, M. M., Chen, B., ... & Morris, S. L. (2007). Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of clinical investigation*, 117(8), 2279-2288.
- [129]. Velmurugan, K., Chen, B., Miller, J. L., Azogue, S., Gurses, S., Hsu, T., ... & Briken, V. (2007). Mycobacterium tuberculosis nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS pathogens*, 3(7), e110.
- [130]. Fieweger, R. A., Wilburn, K. M., & VanderVen, B. C. (2019). Comparing the Metabolic Capabilities of Bacteria in the Mycobacterium tuberculosis Complex. *Microorganisms*, 7(6), 177.
- [131]. Scanga, C. A., Mohan, V. P., Tanaka, K., Alland, D., Flynn, J. L., & Chan, J. (2001). The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of Mycobacterium tuberculosis in mice. *Infection and immunity*, 69(12), 7711-7717.
- [132]. Flynn, J. L., Chan, J., Triebold, K. J., Dalton, D. K., Stewart, T. A., & Bloom, B. R. (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of Experimental Medicine*, 178(6), 2249-2254.
- [133]. Algood, H. M. S., Chan, J., & Flynn, J. L. (2003). Chemokines and tuberculosis. *Cytokine & growth factor reviews*, 14(6), 467-477.
- [134]. Saunders, B. M., Tran, S., Ruuls, S., Sedgwick, J. D., Briscoe, H., & Britton, W. J. (2005). Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of Immunology*, 174(8), 4852-4859.
- [135]. Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., & Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T_H help via APC activation. *Journal of Experimental Medicine*, 184(2), 747-752.
- [136]. Oddo, M., Renno, T., Attinger, A., Bakker, T., MacDonald, H. R., & Meylan, P. R. (1998). Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 160(11), 5448-5454.
- [137]. Flynn, J. L., & Chan, J. (2003). Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis: living with the enemy. *Current opinion in immunology*, 15(4), 450-455.
- [138]. Cowley, S. C., & Elkins, K. L. (2003). CD4⁺ T cells mediate IFN- γ -independent control of Mycobacterium tuberculosis infection both in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4689-4699.
- [139]. Wolf, A. J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2008). Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 105-115.

- [140]. Briken, V., Porcelli, S. A., Besra, G. S., & Kremer, L. (2004). Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular microbiology*, 53(2), 391-403.
- [141]. Dye, C. (2006). Global epidemiology of tuberculosis. *The Lancet*, 367(9514), 938-940.
- [142]. Hill, P. C., Brookes, R. H., Fox, A., Fielding, K., Jeffries, D. J., Jackson-Sillah, D., ... & Otu, J. K. (2004). Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection against a gradient of exposure in The Gambia. *Clinical Infectious Diseases*, 38(7), 966-973.
- [143]. Dannenberg Jr, A. M. (1991). Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology today*, 12(7), 228-233.
- [144]. Marcy, O., Laureillard, D., Madec, Y., Chan, S., Mayaud, C., Borand, L., & Dim, B. (2014). Causes and determinants of mortality in HIV-infected adults with tuberculosis: an analysis from the Camelia Anrs 1295-Cipra Kh001 randomized trial. *Clinical Infectious Diseases*, 59(3), 435-445.
- [145]. Stamm, C. E., Collins, A. C., & Shiloh, M. U. (2015). Sensing of Mycobacterium tuberculosis and consequences to both host and bacillus. *Immunological reviews*, 264(1), 204-219.
- [146]. Choyke, P. L., Sostman, H. D., Curtis, A. M., Ravin, C. E., Chen, J. T., Godwin, J. D., & Putman, C. (1983). Adult-onset pulmonary tuberculosis. *Radiology*, 148(2), 357-362.
- [147]. Molicotti, P., Bua, A., & Zanetti, S. (2014). Cost-effectiveness in the diagnosis of tuberculosis: choices in developing countries. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(01), 024-038.
- [148]. Özakin, C., & Laboratuvarının, G. S. T. T. T. Rolü: Tanı ve İlaç Duyarlılık Testlerinde Rutin Laboratuvar Yöntemlerinin Değeri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 11-12.
- [149]. Barnes, P. F., & Cave, M. D. (2003). Molecular epidemiology of tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 349(12), 1149-1156.
- [150]. Somoskovi, A., Mester, J., Hale, Y. M., Parsons, L. M., & Salfinger, M. (2002). Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Clinics in chest medicine*, 23(3), 585-597.
- [151]. Mostrom, P., Gordon, M., Sola, C., Ridell, M., & Rastogi, N. (2002). Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clinical microbiology and infection*, 8(11), 694-704.
- [152]. Christianson, S., Wolfe, J., Orr, P., Karlowsky, J., Levett, P. N., Horsman, G. B., ... & Sharma, M. K. (2010). Evaluation of 24 locus MIRU-VNTR genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates in Canada. *Tuberculosis*, 90(1), 31-38.
- [153]. Brudey, K., Driscoll, J. R., Rigouts, L., Prodinger, W. M., Gori, A., Al-Hajj, S. A., ... & Binder, L. (2006). Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology*, 6(1), 23.
- [154]. Abramovitch, R. B., Rohde, K. H., Hsu, F. F., & Russell, D. G. (2011). aprABC: a Mycobacterium tuberculosis complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. *Molecular microbiology*, 80(3), 678-694.
- [155]. Sukumar, N., Tan, S., Aldridge, B. B., & Russell, D. G. (2014). Exploitation of Mycobacterium tuberculosis reporter strains to probe the impact of vaccination at sites of infection. *PLoS pathogens*, 10(9), e1004394.
- [156]. Tan, S., Sukumar, N., Abramovitch, R. B., Parish, T., & Russell, D. G. (2013). Mycobacterium tuberculosis responds to chloride and pH as synergistic cues to the immune status of its host cell. *PLoS pathogens*, 9(4), e1003282.
- [157]. Dutt, A. K., & Stead, W. W. (1979). Long-term results of medical treatment in Mycobacterium intracellulare infection. *The American journal of medicine*, 67(3), 449-453.
- [158]. Fox, W., & Sutherland, I. A. N. (1956). A Five-Year Assessment Of Patients In A Controlled Trial Of Streptomycin, Para-Aminosalicylic Acid, And Streptomycin Plus Para-Aminosalicylic Acid, In Pulmonary Tuberculosis1: Report to the Tuberculosis Chemotherapy Trials Committee of the Medical Research Council. *QJM: An International Journal of Medicine*, 25(2), 221-244.
- [159]. Collazos, J., Mayo, J., & Martínez, E. (1995). The chemotherapy of tuberculosis—from the past to the future. *Respiratory medicine*, 89(7), 463-469.
- [160]. Genç Kuzuca, İ. (2016). Tüberküloz hastasında doğrudan gözetimli tedavi (DGT) uygulamasında karşılaşılan etik ikilemler. *Türkiye Biyoetik Dergisi*, 3(3), 165-172.

- [161]. Velayati, A. A., Masjedi, M. R., Farnia, P., Tabarsi, P., Ghanavi, J., ZiaZarifi, A. H., & Hoffner, S. E. (2009). Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest*, 136(2), 420-425.
- [162]. Sotgiu, G., Centis, R., D'Ambrosio, L., & Migliori, G. B. (2015). Tuberculosis treatment and drug regimens. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5: a017822.
- [163]. Zhang, Y., Post-Martens, K., & Denkin, S. (2006). New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug discovery today*, 11(1-2), 21-27.
- [164]. World Health Organization Publications on TB drug resistance
<https://www.who.int/tb/publications/drug-resistance/en/>
- [165]. Hazbón, M. H., Brimacombe, M., Del Valle, M. B., Cavatore, M., Guerrero, M. I., Varma-Basil, M., ... & León, C. I. (2006). Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(8), 2640-2649.
- [166]. Suffys, P. N. (2009). Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America.
- [167]. Cohen, T., Becerra, M. C., & Murray, M. B. (2004). Isoniazid resistance and the future of drug-resistant tuberculosis. *Microbial Drug Resistance*, 10(4), 280-285.
- [168]. Kalokhe, A. S., Lee, J. C., Ray, S. M., Anderson, A. M., Nguyen, M. L. T., Wang, Y. F., ... & Metchock, B. (2013). Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing. *The American journal of the medical sciences*, 345(2), 143-148.
- [169]. Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A., & Gagneux, S. (2017). Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 354-373.
- [170]. Hazbón, M. H., Brimacombe, M., Del Valle, M. B., Cavatore, M., Guerrero, M. I., Varma-Basil, M., ... & León, C. I. (2006). Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(8), 2640-2649.
- [171]. Takayama, K., & Kilburn, J. O. (1989). Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33(9), 1493-1499.
- [172]. Ahmad, S., Jaber, A. A., & Mokaddas, E. (2007). Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. *Tuberculosis*, 87(2), 123-129.
- [173]. Mitchison, D. A. (1985). The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle*, 66(3), 219-225.
- [174]. Scorpio, A., & Zhang, Y. (1996). Mutations in *pnxA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in *tubercle bacillus*. *Nature medicine*, 2(6), 662.
- [175]. Zimhony, O., Cox, J. S., Welch, J. T., Vilcheze, C., & Jacobs Jr, W. R. (2000). Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature medicine*, 6(9), 1043.
- [176]. Juréen, P., Werngren, J., Toro, J. C., & Hoffner, S. (2008). Pyrazinamide resistance and *pnxA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(5), 1852-1854.
- [177]. Palomino, J. C., & Martin, A. (2014). Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*, 3(3), 317-340.
- [178]. Brossier, F., Veziris, N., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V., & Sougakoff, W. (2011). Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(1), 355-360.
- [179]. Rengarajan, J., Sasseti, C. M., Naroditskaya, V., Sloutsky, A., Bloom, B. R., & Rubin, E. J. (2004). The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Molecular microbiology*, 53(1), 275-282.

- [180]. Zhang, Y. (2005). The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 529-564.
- [181]. Chen, J. M., Uplekar, S., Gordon, S. V., & Cole, S. T. (2012). A point mutation in *cycA* partially contributes to the D-cycloserine resistance trait of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *PLoS One*, 7(8), e43467.
- [182]. Lechartier, B., Rybniker, J., Zumla, A., & Cole, S. T. (2014). Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era. *EMBO molecular medicine*, 6(2), 158-168.
- [183]. Andini, N., & Nash, K. A. (2006). Intrinsic macrolide resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is inducible. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(7), 2560-2562.
- [184]. Hartkoorn, R. C., Uplekar, S., & Cole, S. T. (2014). Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of *MmpL5* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(5), 2979-2981.
- [185]. Richter, E., Rüsç-Gerdes, S., & Hillemann, D. (2007). First linezolid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(4), 1534-1536.
- [186]. Zumla, A., Nahid, P., & Cole, S. T. (2013). Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nature reviews Drug discovery*, 12(5), 388-404.
- [187]. Tsolaki, A. G., Hirsh, A. E., DeRiemer, K., Enciso, J. A., Wong, M. Z., Hannan, M., ... & Small, P. M. (2004). Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(14), 4865-4870.
- [188]. Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A., & Gagneux, S. (2017). Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 354-373.
- [189]. Velayati, A. A., Masjedi, M. R., Farnia, P., Tabarsi, P., Ghanavi, J., ZiaZarifi, A. H., & Hoffner, S. E. (2009). Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest*, 136(2), 420-425.
- [190]. Udawadia, Z. F., Amale, R. A., Ajbani, K. K., & Rodrigues, C. (2012). Totally drug-resistant tuberculosis in India. *Clinical Infectious Diseases*, 54(4), 579-581.
- [191]. Skrahina, A., Hurevich, H., Zalutskaya, A., Sahalchyk, E., Astrauko, A., van Gemert, W., ... & Zignol, M. (2012). Alarming levels of drug-resistant tuberculosis in Belarus: results of a survey in Minsk. *European Respiratory Journal*, 39(6), 1425-1431.
- [192]. Black, P. A., Warren, R. M., Louw, G. E., van Helden, P. D., Victor, T. C., & Kana, B. D. (2014). Energy metabolism and drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(5), 2491-2503.
- [193]. Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K. E., Kato-Maeda, M., ... & Yeboah-Manu, D. (2013). Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature genetics*, 45(10), 1176
- [194]. Roberts, C. A., Pfister, L. A., & Mays, S. (2009). Letter to the editor: was tuberculosis present in *Homo erectus* in Turkey?. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 139(3), 442-444.
- [195]. Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., ... & Simon, S. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7877-7882.
- [196]. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G. & other authors (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3684-3689.
- [197]. Firdessa, R., Berg, S., Hailu, E., Schelling, E., Gumi, B., Erenso, G., ... & Zinsstag, J. (2013). *Mycobacterial* lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. *Emerging infectious diseases*, 19(3), 460.
- [198]. Gagneux, S. (2012). Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1590), 850-859.

- [199]. Chen, H., He, L., Huang, H., Shi, C., Ni, X., Dai, G., ... & Li, W. (2017). Mycobacterium tuberculosis lineage distribution in Xinjiang and Gansu Provinces, China. *Scientific reports*, 7(1), 1068.
- [200]. Bañuls, A. L., Thomas, F., & Renaud, F. (2013). Of parasites and men. *Infection, genetics and evolution*, 20, 61-70.
- [201]. Cole, S. T., Eisenach, K. D., McMurray, D. N., & Jacobs Jr, W. R. (2005). *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. ASM press.
- [202]. Türkkani, M. H., Yordam, M. S., Ata, N., & Özdemir, T. (2018). Türkiye'de Tüberküloz Elimine Edilebilir mi?. *Türkiye Klinikleri. Tıp Bilimleri Dergisi*, 38(4), 357-365.
- [203]. Gümü, S. (2011). Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz Epidemiyolojisi. *Turkiye Klinikleri Pulmonary Medicine-Special Topics*, 4(2), 1-6.
- [204]. TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Türkiye'de Verem Savaşı 2018 Raporu. Ankara,2019.<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/tuberkuloz-yayinlar/t%C3%BCberkuloz-db-raporlar.html>
- [205]. Haeili, M., Darban-Sarokhalil, D., Fooladi, A. A. I., Javadpour, S., Hashemi, A., Siavoshi, F., & Feizabadi, M. M. (2013). Spoligotyping and drug resistance patterns of Mycobacterium tuberculosis isolates from five provinces of Iran. *Microbiologyopen*, 2(6), 988-996.
- [206]. Tulu, B., & Ameni, G. (2018). Spoligotyping based genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Ethiopia: a systematic review. *BMC infectious diseases*, 18(1), 140.
- [207]. Gori, A., Bandera, A., Marchetti, G., Degli Esposti, A., Catozzi, L., Nardi, G. P., ... & Moroni, M. (2005). Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. *Emerging infectious diseases*, 11(8), 1242.
- [208]. Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsç-Gerdes, S., Willery, E., ... & Bifani, P. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 44(12), 4498-4510.
- [209]. Devi, K. R., Bhutia, R., Bhowmick, S., Mukherjee, K., Mahanta, J., & Narain, K. (2015). Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from Assam, India: dominance of Beijing family and discovery of two new clades related to CAS1_Delhi and EAI family based on spoligotyping and MIRU-VNTR typing. *PloS one*, 10(12), e0145860.
- [210]. Munro-Rojas, D., Fernandez-Morales, E., Zarrabal-Meza, J., Martínez-Cazares, M. T., Parissi-Crivelli, A., Fuentes-Domínguez, J., ... & Zenteno-Cuevas, R. (2018). Genetic diversity of drug and multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis circulating in Veracruz, Mexico. *PloS one*, 13(3), e0193626.
- [211]. Niemann, S., Diel, R., Khechinashvili, G., Gegia, M., Mdivani, N., & Tang, Y. W. (2010). Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage favors the spread of multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia. *Journal of clinical microbiology*, 48(10), 3544-3550.
- [212]. Barnes, P. F., & Cave, M. D. (2003). Molecular epidemiology of tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 349(12), 1149-1156.
- [213]. Gencer, B., & Shinnick, T. M. (2005). Molecular genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates from Turkey. *American Journal of Infectious Diseases*, 1(1), 5-11.
- [214]. Valcheva, V., Mokrousov, I., Narvskaya, O., Rastogi, N., & Markova, N. (2008). Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating Mycobacterium tuberculosis clinical isolates collected in Bulgaria. *Journal of clinical microbiology*, 46(9), 3005-3011.
- [215]. Zozio, T., Allix, C., Gunal, S., Saribas, Z., Alp, A., Durmaz, R., ... & Sola, C. (2005). Genotyping of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in two cities of Turkey: description of a new family of genotypes that is phylogeographically specific for Asia Minor. *BMC microbiology*, 5(1), 44.
- [216]. Otlu, B., Durmaz, R., Gunal, S., Sola, C., Zozio, T., & Rastogi, N. (2009). Beijing/W and major spoligotype families of Mycobacterium tuberculosis strains isolated from tuberculosis patients in Eastern Turkey.
- [217]. Tuzcu, N., Kayar, B., & Uysal, E. B. (2015). Spoligotyping of M. tuberculosis Strains from Cattle in Turkey. *tuberculosis*, 5, 15.

- [218]. Durmaz, R., Zozio, T., Gunal, S., Yaman, A., Cavusoglu, C., Guney, C., ... & Rastogi, N. (2007). Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from different regions of Turkey. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(4), 513-519.
- [219]. Zeytinli, Ü. O., & Köksal, F. (2012). Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR Yöntemiyle Tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 46(2), 202-210.
- [220]. Kisa, O., Tarhan, G., Gunal, S., Albay, A., Durmaz, R., Saribas, Z., ... & Rastogi, N. (2012). Distribution of spoligotyping defined genotypic lineages among drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates in Ankara, Turkey. *PloS one*, 7(1), e30331.
- [221]. Günal, S. (2006). Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının IS6110RFLP (restriction fragment length polymorphism) ve spoligotyping profillerinin belirlenmesi (Doctoral dissertation, Doktora Tezi, 2006. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya).
- [222]. Durmaz, R., Zozio, T., Gunal, S., Allix, C., Fauville-Dufaux, M., & Rastogi, N. (2007). Population-based molecular epidemiological study of tuberculosis in Malatya, Turkey. *Journal of clinical microbiology*, 45(12), 4027-4035.



ZGEMIŐ

Adı ve Soyadı : Burcu GÜRER GİRAY

Doğum Tarihi : 21.10.1987

E-mail : burcugiray@mersin.edu.tr/burcugurer@gmail.com

ğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	niversite	Yıl
Lisans	Biyoloji/Fen Fakültesi	Muğla Üniversitesi	2009
Yüksek lisans	Tıbbi Mikrobiyoloji/Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Mersin niversitesi	2012

