

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SUŞLARININ**
MIRU-VNTR ve ETR-VNTR YÖNTEMİYLE
MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ

Dr. EMEK ATLAS

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SUŞLARININ**
MIRU-VNTR ve ETR-VNTR YÖNTEMİYLE
MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ

Dr. EMEK ATLAS

Tez Danışmanı

Doç.Dr. NURAN ESEN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TABLO DİZİNİ	i
RESİM DİZİNİ	ii
ŞEKİL DİZİNİ	iii
KISALTMALAR	iv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ	4
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Kısa Tarihçe	7
4.2. Tüberkülozun Dünyada ve Türkiye'deki Epidemiyolojisi	9
4.3. Mikobakteriler ve Sınıflandırılması	11
4.4. Mikobakterilerin Tanısında ve Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	15
4.4.1. Örneklerin İşlenmesi	16
4.4.2. Mikroskopik inceleme	16
4.4.3. Kültür yöntemleri	17
4.4.4. Duyarlılık Testleri	17
4.4.5. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)	18
4.4.5.1. In-house PZT	19
4.5. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	20
4.5.1. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Fenotipik Yöntemler	20
4.5.2. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Genotipik Yöntemler	21
4.5.2.1. Kromozomal DNA Analizi	21
4.5.2.2. PZT bazlı tiplendirme yöntemleri	21
4.5.2.2.1. PZT bazlı bölgeye özgül RFLP	22
4.5.2.2.2. Rasgele çoğaltılan polimorfik DNA	22
4.5.2.3. DNA dizi analizi	22
4.6. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler	22
4.6.1. RFLP	24
4.6.1.1. Hibridizasyon bazlı RFLP	24
4.6.1.1.1. IS6110-RFLP	24
4.6.1.1.2. PGRS-RFLP	25
4.6.2. Spoligotipleme	26
4.6.3. <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i> (MIRU) – <i>Variable Numbers of Tandem Repeats</i> (VNTR)	28
4.6.4. <i>Exact Tandem Repeat</i> (ETR) – VNTR	29
4.6.5. 16S ve 23S rRNA	29
4.6.6. Rasgele çoğaltılan polimorfik DNA PZT	29
4.6.7. <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	29
4.7. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi Alttürlerinin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Yeri	30
5. GEREÇ VE YÖNTEM	32
5.1. Çalışma Grubu	32
5.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> İzolatlarının Moleküler Tiplendirilmesi	32
5.2.1. Mikobakterilerden Genomik DNA İzolasyonu	32

5.2.2. MIRU-VNTR ve ETR-VNTR gen bölgelerinin PZT ile çoğaltılması	33
5.2.3. Jel elektroforez	35
5.3. QBASIC 4.5 ile çalıştırılan yazılımın kodu	37
6. BULGULAR	38
6.1. <i>Mycobacterim tuberculosis</i> izolatlarının MIRU ve ETR gen bölgelerinin tekrar sayılarının belirlenmesi	38
6.2 Kullanılan primerlerin ayrı ayrı ve birlikte ayırım güçlerinin belirlenmesi	43
7. TARTIŞMA	46
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
9. KAYNAKLAR	54

TEŐEKKÜR

Asistanlığım boyunca eğitimimde ve tezimle ilgili çalıŐmalarımda bana her t¼rl¼ desteği sağlayan danıŐman hocam Doç.Dr. Nuran Esen'e, eğitimime katkılarından dolayı başta Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof.Dr. Hakan Abaciođlu olmak üzere t¼m değerli hocalarıma, aynı çalışma ortamını paylaŐmaktan dolayı mutluluk duyduğum t¼m uzman ve asistan arkadaşlarıma teŐekk¼r ederim.

Tezimle ilgili yardımlarından dolayı ve tezimde kullandığım bilgisayar yazılımını oluŐturduđu için Uzm.Dr. H¼seyin oban'a teŐekk¼rlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, beni yetiŐtiren ve bug¼nlere getiren aileme teŐekk¼r¼ bir borç bilirim.

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. MIRU ve ETR gen bölgeleri için belirlenmiş olan tekrarların büyüklükleri	38
Tablo 2. H37Rv suşunun ve 152 hasta izolatının MIRU ve ETR gen bölgelerinin tekrar sayıları	39
Tablo 3. Primer setleri tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen grup sayıları, tanımlanamayan izolat sayısı ve tek izolattan ibaret grup sayıları	44
Tablo 4. 12 MIRU primeri için ayırım gücü en yüksek olan primer seti ve sırasıyla kullanıldıkça ayırım gücünü en fazla arttıran primer setleri ile elde edilen grup sayıları, tanımlanamayan izolat sayısı ve tek izolattan ibaret grup sayıları	44
Tablo 5. 12 MIRU ve 3 ETR primeri için ayırım gücü en yüksek olan primer seti ve sırasıyla kullanıldıkça ayırım gücünü en fazla arttıran primer setleri ile elde edilen grup sayıları, tanımlanamayan izolat sayısı ve tek izolattan ibaret grup sayıları	45

RESİM DİZİNİ

Resim 1. H37Rv(H37) suşu, 10 ve 149 nolu hasta izolatlarının ETR-A(A),

ETR-B(B), ETR-C(C) gen bölgelerinin agar jel elektroforez görüntüleri

38

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı	13
Şekil 2. IS6110-RFLP yönteminin şematik görünümü	25
Şekil 3. Spoligotipleme yönteminin şematik görünümü	27
Şekil 4. <i>M. tuberculosis</i> genomundaki 41 MIRU bölgesi	28

KISALTMALAR

A:	Adenin
ARB:	Aside dirençli bakteri
BAL:	Bronkoalveolar lavaj
BCG:	<i>Bacille Calmette-Guerin</i>
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
C:	Sitozin
CLSI:	<i>The Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ÇİD:	Çoklu ilaç direnci
ddF:	<i>Dideoksi fingerprinting</i>
DGTS:	Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
DR:	<i>Direct Repeat</i>
EMB:	Etambutol
ETR:	<i>Exact Tandem Repeat</i>
EZN:	Erlich Ziehl-Neelsen
FDA:	<i>Food and Drug Administration of the United States of America</i>
G:	Guanin
HIV:	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPA:	<i>Hybridization Protection Assay</i>
INH:	İsoniazid
IS:	İnseriyon sekansları
LJ:	Löwenstein-Jensen
MAC:	<i>Mycobacterium avium</i> kompleks
MIRU:	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i> Mikobakteri tekrarlayan üniteleri
MPTR:	<i>Major Polymorphic Tandem Repeats</i>
NAA:	Nükleik Asit Amplifikasyonu
NALC:	N-Asetil-L-Sistein
NaOH:	Sodyum hidroksit
OT:	Old tüberkülin
PAS:	Para-aminosalisilik asit
PE:	Prolin glutamat
PFGE:	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PGRS:	<i>Polymorphic GC-rich Sequences</i>
PPD:	Pürifiye protein derivelere
PPE:	Prolin-prolinglutamat
PZA:	Pirazinamid
PZT:	Polimeraz Zincir Tepkimesi
RAPD:	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RE:	Restriksiyon enzimi
RFLP:	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIF:	Rifampisin
SDA:	<i>Strand Displacement Amplification</i>
SSCP:	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
T:	Timin
TB:	Tüberküloz
TDM:	Tüberküloz Dışı Mikobakteriler
TMA:	<i>Transcription Mediated Amplification</i>
VNTR:	<i>Variable Number Tandem Repeats</i>

1. ÖZET

***Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının MIRU-VNTR ve ETR-VNTR Yöntemiyle Moleküler Tiplendirmesi**

Dünyada *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının epidemiyolojisi ile ilgili yaygın şekilde araştırmalar yapılmasına karşın, ülkemizde bu konuda yeterli veri bulunmamaktadır. Moleküler tiplendirme yöntemleri *M. tuberculosis* suşlarının epidemiyolojik çalışmalarında önemli yer tutmaktadır. Birçok moleküler tiplendirme yöntemi bulunmasına karşılık son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit* (MIRU) - *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR) yöntemi; ayırım gücü ile tekrarlanabilirliği yüksek, uygulaması kolay, çok merkezli çalışmalara uygun ve otomatize edilebilir bir yöntemdir. MIRU-VNTR yönteminin tüberkülozla ilişkili moleküler epidemiyolojik çalışmalarda kullanımı giderek artmakta, yakın gelecekte diğer yöntemlerin yerine geçeceği düşünülmektedir. Ülkemizdeki diğer moleküler yöntemlerde olduğu gibi MIRU-VNTR profilleri konusunda da yeterli veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, bölgemizden soyutlanan 152 *M. tuberculosis* izolatının MIRU-VNTR yanısıra ETR-VNTR yönteminin de kullanılarak tiplendirilmesi amaçlanmış ve ETR gen bölgesi primerlerinin çalışmaya eklenmesinin, sadece MIRU gen bölgesi primerleri kullanılarak ortaya çıkan ayırım gücüne etkisi araştırıldı.

QBASIC 4.5 programlama diliyle bu çalışma için hazırlanmış bir bilgisayar programı yardımıyla 152 MIRU-VNTR ve ETR-VNTR sonucu retrospektif olarak analiz edildi. Bu program aracılığıyla, 12 MIRU ve 3 ETR gen bölgesinin her primerinin ve primer kombinasyonlarının ayırım gücü yanı sıra oluşan küme sayıları ve tek izolatlar belirlendi.

Elde edilen sonuçlara göre primer setleri tek başlarına değerlendirildiklerinde en yüksek ayırım gücü MIRU 26 primeriyle saptanırken, en düşük ayırım MIRU 39 primeriyle elde edildi. 12 MIRU gen bölgesi primerine 3 ETR gen bölgesi primeri eklendiğinde ortaya çıkan küme sayısının 111 den 122 ye çıktığını ve ETR gen bölgesi primerlerinin ayırma önemli katkı sağladığı görülmektedir. 12 MIRU gen bölgesi primerlerinin kullanımıyla ek olarak 3 ETR gen bölgesi primerlerinin kullanımı yani 15 primerin toplu kullanımı karşılaştırıldığında; ilk dört sırada tercih edilen primerlerde (MIRU 26, MIRU 40, MIRU 16 ve MIRU 10) değişiklik olmadığı saptandı (Tablo 4-5). Fakat gerekli ayırımı sağlamak için kullanılması gereken 5. primer olan MIRU 23'ün yerini ETR-A gen bölgesinin aldığı belirlendi.

Bir tiplendirme yönteminin ayrımı güçlü bir şekilde yapmasının yanında hızlı sonuç vermesi ve ekonomik olması da önemlidir. *M. tuberculosis*'in moleküler olarak tiplendirilmesi gerektiğinde ve epidemiyolojik çalışmalarda yöntemin daha hızlı sonuç vermesi ve ekonomik olması için MIRU ve ETR gen bölgeleri primerlerinin kademeli bir şekilde kullanılması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, moleküler tiplendirme, MIRU-VNTR, ETR-VNTR

2. SUMMARY

Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates using MIRU-VNTR and ETR-VNTR methods

In spite of global epidemiological investigations on *Mycobacterium tuberculosis* isolates, there is insufficient data related to our country. Molecular typing methods play a key role in epidemiological studies. Although many methods were used for molecular typing, recent researches show that *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)-Variable Number Tandem Repeats (VNTR)* method has a high discriminatory power and reproducibility, is easy to perform, and available for multi-centric studies and automation. As is the case in the other molecular typing methods, there is insufficient data for MIRU-VNTR profile related to our country. The aim of this study was molecular typing of 152 clinical isolates which were isolated from our region, by ETR-VNTR in addition to MIRU-VNTR. The addition of ETR loci primers to MIRU loci primers allowed us to assess its effect on discriminatory power when compared to using MIRU alone.

A retrospective analysis of 152 MIRU-VNTR and ETR-VNTR data was performed by a computer based program which was prepared by using QBASIC 4,5 programming language. By this program, individual and combined discriminatory powers of 15 different primers (12 MIRU and 3 ETR loci) were calculated, the clusters were differentiated and unique isolates were identified.

According to the results of this study, MIRU loci 26 has the highest and MIRU loci 39 has the lowest discriminatory power. Our results indicate that the addition of these 3 ETR loci, increases the clusters 111 to 122, and discriminatory power obtained with the 12 MIRU loci. First four primers (MIRU 26, MIRU 40, MIRU 16 ve MIRU 10) which have the highest discriminatory power, remained unchanged when compared 12 MIRU with 12 MIRU and 3 ETR (Table 4-5). However, it was determined that ETR-A loci took the fifth highest place instead of MIRU 23.

Beside discriminatory power, rapidity and cost-effectivity of a typing method is also considerable. As a conclusion, to get more rapid and economic epidemiological investigations and molecular typing of *M. tuberculosis* in case of necessity, MIRU and ETR loci primers have to be performed progressively.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, molecular typing, MIRU-VNTR, ETR-VNTR

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Tüberküloz (TB), insanlar arasında yüksek derecede bulaşıcı bir hastalıktır. Etkin ilaçlar ve korunma önlemlerine rağmen dünya nüfusunun üçte birinin (1,7 milyar kişi) *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olduğu ve klinik TB geçirme riski taşıdığı öngörülmektedir. Günümüzdeki yaklaşımlar değişmezse, önümüzdeki 20 yıl içerisinde yaklaşık 200 milyon kişinin hastalık geçirme riski olacağı öngörülmektedir. Tüberküloz, insan morbidite ve mortalitesinin tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir. TB, 15–49 yaşlar arasında tek bir enfeksiyöz hastalıktan ölüm nedenleri arasında ilk sıradadır. Bu hastalıkla ilişkili olarak, her yıl yaklaşık sekiz milyon yeni aktif olgu ve üç milyon ölüm rapor edilmektedir (1,2). Ülkemizde 2005 yılı verilerine göre TB insidansı yüz binde 26 olarak bildirilmiştir. Enfeksiyon prevalansı da %25 olarak belirlenmiştir. Ülkemizde; TB vakalarının büyük bir kısmı genç nüfusta görülürken, kadınlara göre erkeklerde 2,5 kat daha fazla enfeksiyon gelişmektedir (3).

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

Mikobakterilerin tiplendirilmesinde; biyokimyasal testler, duyarlılık test sonuçları gibi geleneksel yöntemler kullanılmış, fakat yeterli sonuç elde edilememiştir. *M. tuberculosis* kompleks suşlarının ayırımında faj tiplendirmesi de denenmiş, fakat birkaç tipi tanımlayabilmesi ve teknik olarak çeşitli sorunlar içermesi nedeniyle sınırlı kullanım alanı bulmuştur. Serotiplendirme ise, *M. tuberculosis* kompleks içerisindeki suşların farklılıklarını saptayamamıştır. Bu nedenle, *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesinde moleküler yöntemler kullanılmaktadır (4).

Tüberkülozun tanı ve tedavisinin başarılı bir şekilde yapılabilmesi, etkili koruma ve kontrol önlemlerinin alınmasına ve tüberkülozun epidemiyolojisinin anlaşılmasına bağlıdır.

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin gelişmesi, klasik epidemiyolojik verilerin değerlendirilmesine büyük katkı sağlamıştır. Türkiye’de tüberkülozun moleküler epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalar daha çok IS6110 RFLP ve pTBN12 tiplendirme yöntemlerine dayalı olarak yapılmıştır (5,6).

Tiplendirme yöntemlerinin; uygulaması kolay, hızlı, yinelenebilir, ekonomik ve klinik örneğe direkt olarak uygulanabilir olması tercih edilmektedir. Günümüzde kullanılan yöntemler bu kriterlerin tümünü karşılayamamaktadır. Ayrıca, yöntemin ayırım gücü ve stabilitesi epidemiyolojik araştırmalarda önem taşımaktadır. Salgınların kontrol altına alınmasında mikroorganizmalar arasındaki evrimsel çeşitliliğin (genetik yakınlığın) gösterilmesi için genetik belirleyicilere gereksinim duyulmaktadır (7).

M. tuberculosis’in moleküler tiplemesi için altın standart IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) metodudur. Standardizasyonu sağlanmış olmasına rağmen, uzun zaman alması, kültüre gereksinim duyulması, yüksek maliyet, RFLP profillerinin laboratuvarlar arası karşılaştırılmasının zorluğu ve düşük kopya sayılı suşların ayırımındaki yetersizlik, bu yöntemin dünya çapındaki epidemiyolojik çalışmalarda kullanımını sınırlamıştır (7,8).

Son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit* (MIRU)-*Variable Number Tandem Repeats* (VNTR) yöntemi; ayırım gücü ile tekrarlanabilirliği yüksek, uygulaması kolay, çok merkezli çalışmalara uygun ve otomatize edilebilir bir yöntemdir (5,9,10). Tüberkülozun küresel epidemiyolojik sürveyansı için uygundur. Polimeraz zincir tepkimesi (PZT) bazlı bu yöntemle aynı gün içerisinde sonuç verilebilmektedir. IS6110 RFLP ve spoligotiplleme ile kıyaslandığında, MIRU-VNTR tipleme daha fazla ayırıcı profil oluşturmaktadır. Bu nedenle, kabul edilebilir uluslararası standart protokolün adaptasyonunu takiben MIRU-VNTR yöntemi, yakın gelecekte IS6110’u gölgede bırakacaktır (5,9-13).

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

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

4.GENEL BİLGİLER

4.1 Kısa Tarihçe

Mikobakteriyel enfeksiyonların ilk kez M.Ö. 8000 yıllarında, insanların yerleşik toplum düzenine geçmeleri ve sığırları evcilleştirmesiyle birlikte ortaya çıktığı düşünülmektedir. Milyonlarca yıl önce Kuzey Afrika’da ortaya çıktığı kabul edilen ilk insan toplulukları, yaşamak için sığırları ehlileştirmeleriyle *Mycobacterium bovis* ile karşılaşmışlardır. Mikobakteriler, Afrika’dan daha iyi yaşam ortamı bulmak için Nil Vadisine, Avrupa’ya ve sonraki yüzyıllarda diğer kıtalara göç eden insanlar ve beraberlerindeki hayvanlarla daha geniş bölgelere yayılmıştır (14,15).

Verem basilinin yaptığı hastalık batıda “Tüketim Hastalığı” olarak bilinmekteydi. Kapadokya’lı Arateus, veremlileri “*Bedenleri erimiş olduğundan kemikleri belirginleşmiş, gözler soluk ve çökük. Yüzü kadavra güllüşü gibi*” şeklinde tarif etmiştir. Önceleri Phytisis (balgamlı öksürük ve hırıltı) olarak bilinen tüberküloz, batı dünyasında beyaz ölüm, beyaz veba, bizde ise ince hastalık, teverrüm, duman olarak anılmaktadır (15).

Mısır’da, M.Ö. 5000, Hindistan’da M.Ö. 3300 ve Çin’de M.Ö. 2300 yıllarına ait kaynaklarda tüberkülozu düşündüren ifadeler bulunmaktadır. M.S. 700 civarında Peru’da ve Mısır’da bulunan mumyalarda Pott hastalığına dair bulgular saptanmıştır (14,16).

Sığır tipi verem basili, DNA’sını değiştirerek daha virülan olan insan türü *Mycobacterium tuberculosis humanus*’a dönmüş ve bu değişiklik insanları kırıp geçirmiştir. XVIII ve XIX. yüzyıllarda Avrupa nüfusunun %70’i vereme yakalanmış ve bunların 1/7’si ölmüştür. Verem, yoksulların ve sanatkarların erken yaşta ölmesine sebep olmuştur. Eşi de tüberkülozdan ölmüş olan Dubois, endüstri devriminde Manchester şehrinde işçilerde veremin sık görülmesini “*Verem epidemisi, insafsız sömürsü nedeniyle kapitalist toplumun ödemiş olduğu kefarettir*” diye özetlemiştir (15).

Bugün tüberküloz hastalığının kliniği ve patolojisi hakkındaki bilgiler, 1781-1826 yılları arasında yaşamış olan Rene Theophhile Hyanchinthe Laenec’in tüberküloz üzerine yaptığı değerli çalışmalar sonucudur. Yaptığı klinik ve otopsi çalışmaları ile tüberkülozdaki fizik bulgular ve patolojik formlarını eserlerinde anlatmıştır. Solunum sisteminin muayenesinde kullanılan perküsyon yöntemi Leopold Auenbrugger; oskültasyon bulguları da Rene Laenec tarafından geliştirilmiştir (14,15).

Ölümün kaptanı olarak nitelendirilen verem basili insanların en kurnaz düşmanlarından. *M. tuberculosis*’in verem hastalığının sebebi olduğu, 1843-1910 yıllarında

yaşamış olan Dr.Robert Koch tarafından gösterilmeden önce kalıtsal bir hastalık olarak biliniyordu. Koch, 1882 yılında tüberkülozdan ölen hastasının akciğerindeki lezyonlarında; basili göstermiş, kültürde üretmiş ve üretilen basil ile deney hayvanlarında verem oluşturmuştur. Bulduğu basile *Mycobacterium tuberculosis* adını vermiş ve araştırma sonuçlarını 1882 yılında sunmuştur (14). Tedavinin aşı ile yapılabileceğini düşünen Koch, 1890 yılında Berlin’de yapılan Uluslararası Tıp Kongresinde, bedene zarar vermeden orada yaşayan bakteriyi zararsız hale getirmenin mümkün olduğu görüşünü savunmuştur. Isıtılarak öldürülen basil atıklarının hastaların bağışıklık sistemini kamçılayacağını düşünmüştür. Clemence vonPirquet ile birlikte Koch, old tüberkülin (OT)’i tedavi amacıyla kullanmışlardır. Bugün uygulanan dozun 12.000 katının kullanıldığı tüberkülin araştırmalarının ilk sonuçları ümit vermişti. Ancak bu tedavi sadece hafif vakalarda etkili olup, ileri vakalarda zarar vermeye başlayınca istatistiki verilere ağırlık veren Prusya’lı Prof.Guttstadt tüberkülinin tedavide kayda değer bir yararı olmadığını yayınladı (14,15).

1895 senesinde Pasteur enstitüsünde çalışmaya başlayan Dr. Albert Calmette, Camile Guerin ile birlikte verem aşısı üzerinde çalışmalara ağırlık verdi. Patates-gliserin-safralı vasatta 20 yıl, 230 pasajla hastalık yapamaz duruma gelince verem aşısı için gerekli olan zararsız basil bulundu ve buna iki araştırmacının isimlerine izafeten Bacille Calmette-Guerin (BCG) adı verildi. Aşının koruyucu olduğu önce hayvanlarda sonra da 630 çocukta gösterildi. Avrupa’da BCG yaygın olarak kullanılmaya başlandı. Ancak, yanlışlıkla BCG suşunun virülen verem basiliyle karıştırılması sonucu Lübeck şehrindeki çocuklardan 73’ü öldü, 135’i ise vereme yakalandı. BCG aşısı İsveç’te yaygın olarak kullanılmaya başlaması Calmette’yi mutlu etmiş fakat bunalımdan çıkaramamıştı. Ona ulusal ve uluslar arası ödüller verildi (14,15).

XX. yüzyılın başlarında, sert ve temiz dağ havasının iyi geldiği düşüncesiyle, yüksek yerlerde sanatoryum denilen verem hastaneleri kuruldu. İlk sanatoryumun 1854 yılında Almanya’da açılmasıyla tüberküloz tedavisinde farklı bir yaklaşım başladı. Kısa bir süre sonra tüm Avrupa’da ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’de yaygınlaşan bu uygulamada, dağ yamaçlarındaki kuruluşlarda zengin bir diyet, hafif egzersiz ve 8-12 saatlik dağ havasıyla temas sağlanmaktaydı. W. Roentgen’in 1895 yılında X ışınını bulmasından sonra sanatoryumlar; radyolojik, bakteriyolojik ve loroskopik incelemelerin yapıldığı tüberküloz tanı, tedavi ve araştırma merkezleri haline geldi (17).

Yüzyılımızın başında tüberküloz tedavisinde cerrahi yaklaşımlar başladı. Yirminci yüzyılın ilk yarısında tüberküloz tedavisine egemen olan sanatoryum ve cerrahi tedavi yaklaşımı, modern kemoterapinin başladığı 1950'li yıllardan itibaren giderek azaldı (14).

Tüberküloz tarihinde yeni bir dönem 1940'ların ortasında ABD'de streptomisin ve İsveç'te para-aminosalisilik asit (PAS)'in bulunması ile başlamıştır. Tek başına kullanılan bu ilaçlara bir ay gibi kısa zaman içinde direnç gelişimi büyük hayal kırıklarına yol açmış ve yeni ilaç bulma çabalarını da zorunlu kılmıştır. 1952 yılında Robizek ve Selikof tarafından izoniazid (INH)'in bulunmasından sonra üç ilaçla 18-24 ay süren kombine tedavinin uygulanması sonucu tüberküloz tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir. Daha sonra 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB) ve 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur (18).

Batı ülkelerinde, yetmişli yıllarda tüberküloz sorununun bittiği ve hastalık eradikasyonunun kısa sürede gerçekleşeceği düşünüldüyse de 1985 yılından itibaren insidans yeniden artmaya başladı. Gelişmekte olan ülkelere kayıt sistemlerindeki yetersizlik nedeniyle 1950 öncesi durum hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün önerisiyle bu ülkelerde 1960'lardan sonra uygulanmaya başlanan, erken tanı, tedavi ve aşılama öneren, tüberküloz kontrol programlarının 1990'lı yıllarda yetersiz olduğu görüldü (14,17,18).

4.2. Tüberkülozun Dünyada ve Türkiye'deki Epidemiyolojisi

Tüberküloz (TB) hastalığı, 21. yüzyılın başında hala tüm dünyanın en önemli sağlık sorunlarından. DSÖ, dünyada TB hasta sayısının artışında dört önemli unsuru vurgulamıştır:

- 1) Hükümetlerin hastalığı ihmal etmeleri sonucunda TB kontrol sistemleri kötüleşmiş ve hatta birçok yerde kaybolmuştur.
- 2) Kötü yönetilen ya da doğru yaklaşımların uygulanmadığı TB kontrol programları hastalığın artışı yanında ilaca dirençli tüberkülozun artışına yol açmıştır.
- 3) TB ve HIV'in birlikte olduğu hallerde, HIV'in endemik olduğu yerlerde TB patlayıcı artış yapmıştır.
- 4) Nüfus artışı TB olgu sayılarında artışa yol açmıştır. Hastalık insidansının yüksek olduğu ülkelere göçlerle gelen TB olguları, sanayileşmiş ülkelere artış nedenlerinden birisini oluşturmaktadır.

Dünya nüfusunun üçte birisinin yani yaklaşık 2 milyar kişinin TB basiliyle enfekte olduğu tahmin edilmektedir. DSÖ'nün Küresel TB Kontrolü 2003 raporunda, 2001 yılında dünyada kayıtlı TB hasta sayısının 3.813.109, bunlardan 1.602.153'ünün yayma pozitif olduğu belirtilmektedir. Buna karşın tahmin edilen toplam hasta sayısı 8.464.000, yeni yayma pozitif olgu sayısı 3.745.000'dir. Dünyada tahmin edilen TB insidansı 2001 yılında 138/100.000, yayma pozitif TB insidansı ise 61/100.000'dir (1). Dünyada TB insidansı yılda %0,4 artmaktadır. Bu artış, Sahra Güneyi Afrika ve Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde daha fazladır. TB hastalığına bağlı yılda yaklaşık 2 milyon insanın öldüğü tahmin edilmektedir. Çoğu önlenilebilir olan bu hastalık nedeniyle ölümler genellikle genç ve erişkin yaş gruplarındadır.

Dünyadaki TB hastalarının yüzde 80'inin bulunduğu, yüksek olgu yükü olan ülkelerin sayısı 22'dir. Bu ülkelerden 12'si Asya'da, 9'u Afrika'da ve 1'i Güney Amerika'dadır. Hindistan, Çin, Endonezya, Nijerya ve Bangladeş en çok hastanın olduğu beş ülkedir. Sahra Güneyi Afrika ile Güney Doğu Asya'da HIV ve TB birlikteliği büyük sorundur. Son yıllarda Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde de bu iki hastalığın birlikteliği artış göstermektedir (1,19)

DSÖ, 1993 yılında TB için acil durum ilan etmiş ve son 10 yılda uluslararası alanda tüberküloza karşı güçlü bir halk sağlığı hareketi başlatılmıştır. Veremle savaşta DSÖ "Doğrudan gözetimli tedavi stratejisi" (DGTS)'ni esas almaktadır. Bu strateji, semptomatik hastalarda; bakteriyolojik tanı, gözetimli tedavi, kayıt-raporlama-analiz sistematığının kurulması, ücretsiz ilaç ve bütün bunları yürütmek için politik iradenin ortaya konması unsurlarını içermektedir. 1991 yılında sadece üç ülkede uygulanmaya başlayan DGTS, 2001 yılında 155 ülkede uygulanır hale gelmiştir. Dünyadaki TB hastalarının %32'si bu stratejinin uygulandığı bölgelerdedir. DSÖ, 2000 yılında, yayma pozitif hastaların %70'ine tanı koymak ve bunların %85'inde kür sağlamak hedefine ulaşamayınca, 2005 yılı için de aynı hedefi koymuş ve bu hedefe ulaşmak için özellikle yüksek olgu yükü olan ülkelere yönelik yeni bir program uygulanmaya başlanmıştır. 2007 yılında özellikle çoklu ilaç direnci (ÇİD)-TB hastalarının önemli boyutlarda olduğu bölgelerde, DGTS programının ilaç duyarlılık test sonuçlarına göre uygulanmasını, gerekirse ikinci grup TB ilaçlarının kullanılmasını içeren DGTS-Artı yaklaşımına geçilmiştir (1,19).

Geçen yüzyılın başında Türkiye'de ciddi bir epidemiyeye neden olan TB, bütün ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almıştır. Ülkemizde TB ile etkin mücadele 1950'li yıllarda başlatılmış ve 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur. Bunun sonucu olarak 1945 yılında TB ölümleri 262/100.000 iken, 1950 yılında 204/100.000'e düşmüştür (20).

Verem Savaş Daire Başkanlığının 2007 raporuna göre (21); 1965’de 172/100.000 olan TB insidansı 2005 yılında 26/100.000 olarak bildirilmiştir. 2005 yılında Türkiye genelinde toplam hasta sayısı 20.535, yeni vaka sayısı 18.753 olarak bulunmuştur. Bu rakamların Türkiye’de tüm hastaları içermediği bilinmektedir. Aynı rapora göre; ülkemizde tüberküloz hastalarının %61,66’sının 15–44 yaş arası genç yaşta hastalar olduğu bildirilmiştir. Verem Savaş Daire Başkanlığının 2007 raporuna göre; ülkemizde TB’un mikrobiyolojik tanısının konulmasında da eksiklikler olduğu görülmektedir. 2005 yılında akciğer TB’lu hastaların yaklaşık yarısının (%55,6) yayma pozitif olduğu ve %38,1’inin kültür pozitif olduğu bildirilmiştir (21).

Dünyada 1999 yılı kohortunda, Türkiye DGTS uygulanmayan bir ülke olarak listelenmekte ve tedavi sonucu vermeyen, yani değerlendirilemeyen ülkeler arasında kayıtlara geçmekteydi (1). DGTS’ne yönelik ilk uygulamalar 2000 yılında başlamış, 2003 yılı itibarıyla pilot olarak uygulanmış, 2006 yılında ise tüm ülke geneline yaygınlaştırılmıştır. 2005–2006 yılında DGTS’ye hazırlık olarak yapılan eğitimler ve formların yenilenmesi, bireysel veri tabanına geçiş ve yapılan değerlendirmeler sonucunda Türkiye DSÖ’ne veri gönderen ülkeler arasında yer almıştır. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı tarafından yürütülen “Türkiye Ulusal Tüberküloz Sürveyans Araştırması” ile toplanan ve değerlendirilen veriler 2007 yılı raporu olarak yayınlanmıştır (20,21).

4.3. Mikobakteriler ve Sınıflandırılması

Mycobacteriaceae ailesinde sadece *Mycobacterium* cinsi bulunmaktadır. Mikobakteriler; sporsuz, hareketsiz, aside dirençli, bölünme süreleri 12–18 saat olması nedeniyle yavaş üreyen, pleomorfik çomaklardır. Çoğu doğada saprofit olan mikobakterilerin sadece küçük bir oranı yüksek vertebralı hayvanlarda ölümle sonlanabilen hastalıklara neden olan hücre içi patojenlerdir. Mikobakterilerin insanlarda enfeksiyon oluşturan türleri arasında, tüm dünyada önlenebilir ölümlerin en önemli sebepleri arasında yer alan tüberküloz da yer almaktadır. Son derece özelleşmiş hücre duvar yapıları ile korunarak kronik enfeksiyonlara yol açabilmektedirler (17).

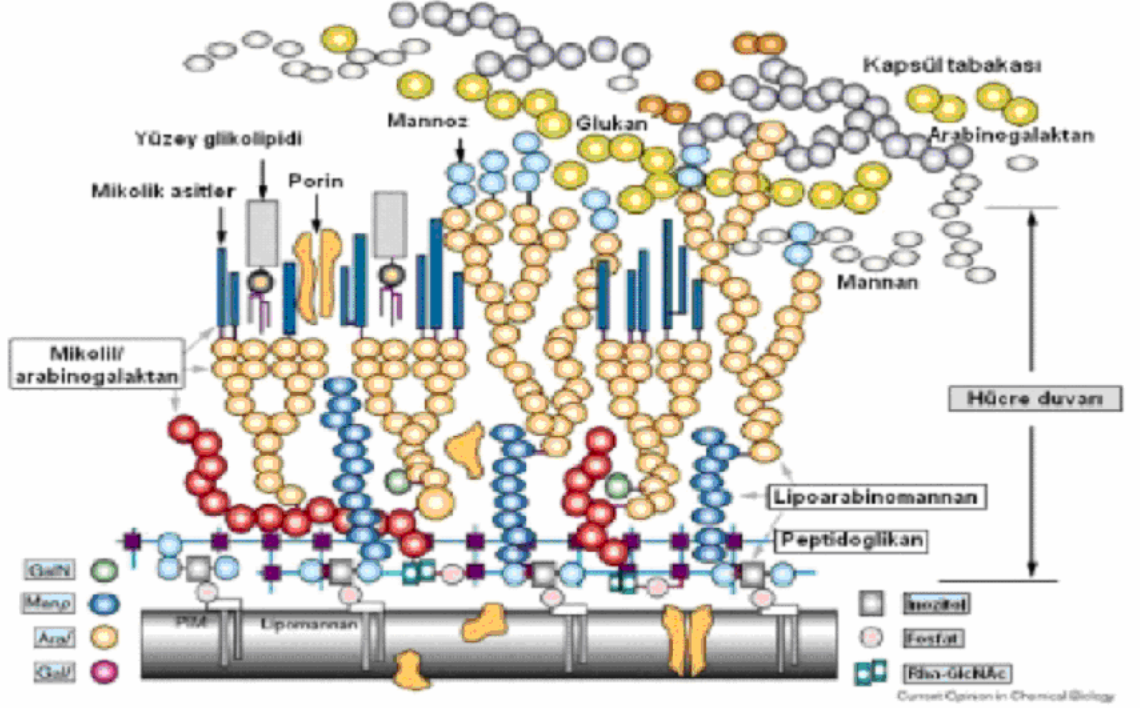
Mikobakteri genomunda 20 değişken bölgede meydana gelen insersiyon ve delesyonları dikkate alarak yapılan çalışmalarda filogenetik ilişkileri belirlenen yaklaşık 100 farklı tür olduğu saptanmıştır. Bakteriyolojik özellikleri ve moleküler düzeyde benzerlikleri bulunan yakın ilişkili türler kompleks başlığı altında toplanmaktadır (17,22). Kültürü yapılabilen mikobakteriler, *M. tuberculosis* kompleks ve tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. *M. tuberculosis* komplekse dahil olanlar genetik olarak çok yakın olduğundan tür yerine alttür tanımlaması kullanılmaktadır (17).

Kompleks içerisindeki alttürleri; *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* ve *Mycobacterium canettii* ve TB aşısını oluşturan atenué *M. bovis* BCG oluşturmaktadır. *M. tuberculosis* kompleksin alttürlerinin ayrımı, biyokimyasal testler ve üreme özellikleriyle yapılması zor olduğundan, DNA parmak izi analizi yönteminin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (7,17,23).

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

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı alışlagelmiş Gram negatif veya pozitif bakteri hücre duvarlarından oldukça farklı, karmaşık bir yapıdır. Hücre duvar yapısının altında diğer bakterilerde de görülen plazma membranı vardır. Plazma membranının üzerinde bulunan en iç tabaka peptidoglikandır. Bu tabaka kısa peptit zincirleri, çapraz bağlarla sıkıca bağlanan uzun polisakkarit zincirleri içerir ve hücrenin sert yapısını sağlar. Peptidoglikan tabakasına fosfodiester köprüleriyle bağlı olan arabinogalaktan tabakası hücre duvarının %35'ini oluşturur (Şekil 1). Arabinogalaktanlara kovalent olarak bağlanan mikolik asitler, hücre duvar kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Mikolik asitler, trehaloz dimikolata bağlanarak kord faktörü oluştururlar. Bir grup heterojen peptidoglikolipitler veya fenolik glikolipitten oluşan en dış tabaka ise mikozitler olarak

adlandırılırlar. Hücre duvarında bulunan ve duvar ağırlığının %60'ını oluşturan lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitleridir. Bu lipidler tüberkülostearik asit, mikoserik asit ve mikolik asitleri içerirler (27,28).



Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı (29)

Mikobakterilerin lipid, protein ve polisakaritlerden oluşan antijenleri vardır. Bunlardan OT, Robert Koch tarafından bulunan ve tüberkülin deri testinde kullanılan ısıya dayanıklı bir proteindir. OT'in saflaştırılması ile elde edilen pürifiye protein deriveleri (PPD), DSÖ'nün de önerisiyle tüberkülin deri testinde kullanılmaktadır. Kord faktörü, bakterinin virulansı ile ilgilidir. Kültürden hazırlanan preparatlarda bakterinin demetler halinde bir arada bulunmasından sorumlu olduğu gibi PNL migrasyonunu önleme ve granülom oluşumunu stimüle etme gibi fonksiyonlara da sahiptir. Sulfolipitler (trehaloz 2 sulfat), bakterinin hücre içinde canlı kalmasından ve kord faktörle sinerji oluşturmasından sorumludur. Isı şok proteinlerinin (65Kda, 38Kda, 12Kda), koruyucu immünite gelişmesinde ve komplikasyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir (30).

Mikobakterilerle ilgili çalışmalar; *M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. lepra* türlerinin gen analizlerinin yapılmasından sonra hızlanmış, bakterinin fizyolojik, biyokimyasal, antijenik ve genetik özellikleri hakkındaki bilgiler artmış, bu bilgilerin ışığında yeni profilaksi ve tedavi

çalışmaları başlamıştır. *M. tuberculosis* H37Rv suşunun gen büyüklüğü 4.411.529 baz çifti (bç) olup yaklaşık 3.986 proteini kodlamaktadır. Buna karşılık *M. tuberculosis* CDC1551 suşu 4.403.836 bç olarak saptanmış ve yaklaşık olarak 4.187 proteini kodladığı bildirilmiştir. *M. lepra* genomu ise 3.300.000 bç kadardır. Bu suşlarda tanımlanabildiği kadarı ile genomun büyük kısmının (%59) replikasyonla ilgili olduğu, kalan bölgenin %30'unun lipit ve poliketit sentetaz ile ilgili genler, %10'ununda PE (prolin glutamat) ve PPE (prolin-prolinglutamat) olarak tanımlanan iki akraba gen ailesine ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca “noncoding” diziler (13E12 ailesi), insertion dizileri (IS) ve mikobakterilere özgün “Mikobakteri tekrarlayan üniteleri” (MIRU) kodlayan gen bölgeleri de saptanmıştır. Mikobakterilerde PE ve PPE proteinlerini kodlayan gen dizileri dışında kalan bölgelerde Guanin (G) + Sitozin (C) oranının da alışımlı bakterilerden daha yüksek oluşu (%80), bunların farklı bir gen ailesi oluşturduğunu göstermektedir (26,28,31,32).

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

Mikobakteriler hücre duvarı komplekslerinin düşük permabilite ve hidrofobisite özellikleri nedeniyle hidrofilik antibiyotikler, metal iyonları, dezenfektanlar gibi kimyasal toksik ajanlara ve oksijen radikalleri gibi hücresele toksinlere intrinsik direnç sahiptirler. Bu özellikleriyle hücre içi ve hücre dışında korunan mikobakteriler, hücre duvarlarındaki bazı yapılarla konağın bağışık yanıtını da etkileyerek, asemptomatik taşıyıcılıktan tedaviye cevap vermeyen ve yüksek mortaliteyle seyreden kronik granümatöz enfeksiyonlara kadar değişen klinik tablolara yol açarlar (28,31).

Tüberküloz; ateş, öksürük, kanlı balgam, kilo kaybı, halsizlik gibi semptomlar vermektedir. İlerleyici akciğer hasarı oluşur ve bakterilerin akciğer dışına çıkması ile kemikler, eklemler, karaciğer, dalak, gastrointestinal sistem ve beyin tutulumu olabilir. Hastalığın sistemik formu olan milier TB ise sıklıkla ölümcül seyretmektedir.

Öksürme ile ortama salınan çok küçük damlacıklar, hem üst solunum yolu savunma mekanizmalarını aşarlar, hem de büyük partiküllere oranla havada daha fazla asılı kalırlar. İnsandan insana aerosollerle bulaşan TB hastalığı genellikle sinsi seyretmekte, hastanın sağlığı yıllar içerisinde bozulmaktadır. AIDS'li hastalarda ise TB çok daha hızlı ilerlemekte, aylar içerisinde ilerleyerek %80'lere varan ölüme neden olmaktadır (18,30).

Son yıllarda özellikle, gelişmiş toplumlarda doğumsal veya kazanılmış bağışıklık yetmezlik artışına bağlı olarak, *M. tuberculosis* izolatlarında çoklu ilaç direncinin artması ve bu suşlarla oluşan enfeksiyonlardan %70'inin 4–6 hafta gibi daha kısa bir sürede ölümle sonlanması mikobakterilerle ilgili çalışmaların yeniden hız kazanmasına neden olmuştur. Mikobakterilerde 1960'lı yıllarda iki ilaca karşı %1–2 oranında olan direnç, 1991 yılında dört ilaca karşı %13 gibi yüksek oranlara ulaşmıştır. Bu nedenle çalışmaların odağını daha etkili, özellikle bakterisidal yeni antibiyotikler ve koruyucu bağışık yanıtı uyaraabilecek yeni aşılar yaratmak oluşturmaktadır. Bu amaçlara ulaşabilmek için de mikobakteri hücre duvar yapısı, fizyolojik ve kimyasal özellikleri ve biyosentez mekanizmalarının çok iyi incelenmesi gerekmektedir (28,31).

4.4 Mikobakterilerin Tanısında ve Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Klinik, radyolojik ve/veya patolojik bulgularla bir hastada tüberkülozdan kuşulanılabilir. Ancak hastalığın kesin tanısı sadece klinik örneklerde tüberküloz basilinin varlığının kanıtlanması ile mümkündür. TB tanı yöntemlerinin amacı, klinik örneklerde mikobakterilerin varlığını göstermek ve hastalık etkeni olan türü izole etmektir. Tanının tam

ve doğru olarak yapılabilmesi uygun örneğin, uygun yöntemle alınmasına, uygun koşullarda laboratuvara gönderilmesine, uygun yöntemle işlenmesine bağlıdır. Tüberküloz laboratuvarına gönderilen solunum yolu örnekleri arasında balgam, indüklenmiş balgam, açlık mide suyu, bronkoalveolar lavaj (BAL), bronşiyal fırçalama örnekleri bulunur. Solunum yolu dışında ise idrar, doku biyopsi, beyin omurilik sıvısı (BOS), periton sıvısı, plevra sıvı ve perikardiyal sıvı gibi örnekler sayılabilir (33).

4.4.1. Örneklerin İşlenmesi: Mikobakterilerle birlikte kontaminasyona neden olabilen bakteri, mantar ve bu mikroorganizmaların etrafını saran lökosit, eritrosit ve doku gibi organik kalıntılar besiyerlerinde üremeyi baskırlar. Balgam gibi normalde steril olmadığı düşünülen örneklerde bu organik kalıntıları sindirmek ve kontaminasyona neden olan organizmaları elimine etmek için dekontaminasyon ve homojenizasyon, ardından bakteri yoğunluğunu artırmak amacıyla konsantrasyon işlemi uygulanır. Laboratuvarında tüm işlemler biyogüvenlik kabinlerinde ve belirli standartlara uyularak yapılmalıdır (33).

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

A. Karbol fuksin boyama; ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilir.

a. Erlich Ziehl-Neelsen (EZN)

b. Kinyoun

B. Florokrom boyama; floresan mikroskobu kullanılarak değerlendirilir.

a. Auramin-Rodamin

b. Auromin O

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

4.4.3. Kültür yöntemleri:

Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen tür düzeyinde tanımlama için izolatların elde edilebilmelerini, bakterilerin canlılıklarının doğrudan gösterilmelerini, ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastaların doğru tedavi edilebilmelerini, çoğaltılan izolatların daha sonraki araştırmalar için saklanmalarını sağlaması açısından, TB'un tanısında altın standart olmaya devam etmektedir. Mikobakteri kültürü için sıvı ve katı besiyerleri kullanılabilir. Katı besiyerleri yumurta bazlı besiyerleri ve agar bazlı besiyerleri olarak iki grupta incelenebilir. Bu besiyerlerinin tümü, antibiyotik eklenerek seçici hale getirilebilir. En hızlı üreme sıvı besiyerlerinde gözlenmekte, ancak koloni morfolojisini inceleme şansı olmamaktadır. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) mikobakterilerin birincil izolasyonunda klasik katı besiyerleri yanı sıra sıvı besiyerlerinin de birlikte kullanılmasını önermektedir. Eğer iki katı besiyeri kullanılacaksa besiyerlerinden birinin seçici olması önerilmektedir (30,33).

4.4.4. Duyarlılık Testleri

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

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

4.4.5. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT):

TB'un laboratuvar tanısında ARB mikroskobisinin duyarlılığının düşük olması, kültür de üremenin uzun zaman alması, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren yeni yöntem arayışlarına neden olmuştur. Moleküler yöntemler, özellikle mikroskopi ile görülmesi, kültürde üretilmesi uzun zaman alan, zor veya olanaksız mikroorganizmaların saptanmasında önemli rol oynamaktadır. Moleküler yöntemler oldukça hızlı olmaları ve tanımlama aralıklarının genişliği nedeniyle mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında da yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu moleküler yöntemlerin tüberküloz tanısında kullanımının yaygınlaşması tüberküloz tanısına hız kazandırmıştır. Moleküler testler doğrudan klinik örneklerden *M. tuberculosis*'in saptanması yanında, kültürde üretilen mikobakteri türlerinin saptanması veya tiplendirilmesi, antimikobakteriyal ilaçlara karşı dirençli olup olmadıklarının araştırılması ve epidemiyolojik araştırmalarda da kullanılmaktadır (40,41).

Klinik örnekten TB tanısına yönelik moleküler testler genel olarak nükleik asit amplifikasyonu (NAA) temeline dayanmaktadır. Bu testlerde diğer enfeksiyon etkenlerinde olduğu gibi *M. tuberculosis*'in özgül nükleik asit dizisinin, saptanabilecek düzeye gelinceye kadar çoğaltılması amaçlanmaktadır. Bu sistemler için primer çoğaltma hedefleri *M. tuberculosis*'e özgül IS6110 insersiyon dizisi ve 16S rRNA geni ile 23S rRNA'dır (40,41,42). Klinik örnekten TB tanısına yönelik moleküler yöntemler genellikle üç ana basamaktan oluşur: İlk basamak klinik örnekten mikroorganizmanın nükleik asitlerinin elde edildiği ekstraksiyon basamağıdır. Fenol-kloroform yöntemi, distile suda kaynatma, deterjanlar ile proteinaz K, değişik kimyasalların kullanımı (Chelox-100, Guanidin vb.) ve sonikasyon gibi

değişik ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Ayrıca ticari olarak kullanılan DNA/RNA ekstraksiyon kitleri de mevcuttur. İkinci basamakta hedef nükleik asit bölgesinin (DNA veya RNA) saptanabilir düzeye gelinceye kadar çoğaltılması değişik tekniklerle gerçekleştirilebilir. Bu tekniklerden en sık kullanılanlar arasında PZT, TMA (Transcription mediated amplification), SDA (Strand displacement amplification) sayılabilir. Üçüncü basamakta çoğaltılmış olan hedef bölgenin (amplikon) özgül problemlerle saptanması da değişik tekniklerle gerçekleştirilebilmektedir [hibridizasyon, ters hibridizasyon (*revers hybridization*), DNA-ELISA, gerçek zamanlı saptama (*real-time detection*), *hybridization protection assay* (HPA) gibi] (17,42). Klinik örneklerden *M. tuberculosis*'in saptanmasında in-house yöntemler kullanılabilmesine karşın, son yıllarda çok sayıda ticari testler piyasaya sürülmüş ve bunlardan ikisi tanı amaçlı kullanım için ABD'de FDA (Food and Drug Administration) onayı almıştır. Günümüzde otomatize veya yarı otomatize ve standardize ticari testler giderek artan oranda rutin tanıda kullanılmaktadır (17,33,40).

4.4.5.1. In-house PZT: Geleneksel in-house PZT, nükleik asitlerin istenilen kısımlarının, bölgeye özel, sentetik oligonükleotid primerleri kullanılarak, in vitro ortamda kopyalanmasını esas alır. Hedef olarak rRNA veya genomik DNA'nın ayırıcı özellik taşıyan farklı bölgeleri kullanılabilir. Kopyalama işlemi kısa sürmesi büyük bir avantajdır. Yöntemin bir diğer avantajı, az miktarlarda hedef molekül olduğu hallerde dahi sonuca gidebilmektir. PZT için, mililitrede 10 basil bulunması tanı için yeterli olmaktadır. Burada en önemli faktör, DNA kontaminasyonudur. DNA dayanıklı bir moleküldür. Laboratuvar uygulamaları sırasında aerosol ile reaksiyona girerek, yalancı pozitiflik yaratabilir. Bununla birlikte, çalışılan materyalin türüne göre, PZT'nin inhibe olması söz konusu olabilir ki bu da yalancı negatif sonuçların ortaya çıkmasına neden olur. Yöntemin güvenilirliğinin sağlanması için mutlaka negatif ve pozitif kontrollerle çalışılmalı, sonuçlar klinik bulgular ve diğer laboratuvar yöntemleri ile bir arada değerlendirilmelidir (17,40).

DNA'nın çoğaltılabilmesi için PZT tepkime karışımında olması gerekenler; DNA ekstraktı, primerler, dNTP karışımı, DNA polimeraz, tamponlar ve $MgCl_2$ 'dir. Tüm karışım "*thermal cycler*" aletine yerleştirilir ve özgül programı uygulanır. Çoğaltılan PZT ürünleri değişik yöntemlerle belirlenir. En yaygın kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir. Agaroz jel elektroforezinde görülebilmesi için floresan bir boyayla boyanır. Oluşan DNA bantları UV ışığı altında görünür hale gelir (43). In-house (home-Brew) PZT olarak tanımlanan teknikte standardizasyon eksikliği, laboratuvarlar arası değişen duyarlılık ve özgüllüklere neden olmaktadır. Bir çalışmada yedi farklı laboratuvarda aynı 200 örnek

çalışılmış ve %3–77 arasında değişen yanlış pozitif sonuçlar elde edilmiştir (44). In-house PZT kullanılarak yapılmış 84 çalışmanın bulgularının değerlendirildiği bir meta analiz sonucunda duyarlılık ve özgüllüğün sırasıyla %9–100 ve %6–100 arasında değiştiği görülmüştür (45). Bu nedenle günümüzde klinik örneklerde *M. tuberculosis* saptanmasında daha standardize moleküler testler tercih edilmektedir (42).

4.5. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

Tiplendirme yöntemlerinde bazı özellikler aranmaktadır:

- Sonuçların yinelenebilirliği: Belirli bir suşla yinelenen yöntemin, aynı sonucu verebilme yeteneği olarak tanımlanabilir. Epidemiyolojik olarak birbiriyle ilişkili hastalardan elde edilen bir suşun aynı veya benzer tiplendirme sonucunu vermesidir.
- Ayrım gücü: Tipleme yönteminin bir türün farklı suşları arasında etkin ayırım yapabilme özelliğidir.
- Tekniğin kullanım kolaylığı, fiyatı, sonuç verme süresi ve sonuçlarının kolay yorumlanabilir olması: Tipleme yöntemi basit ve ekonomik olmalıdır. Yöntemin kolay uygulanabilirliği ile klinik laboratuvarlarda yaygın kullanımı arasında ilişki vardır. Teknik olarak karmaşık olan yöntemler, rutin uygulamalardan çok referans laboratuvarlarda kullanılmaktadırlar.

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

4.5.1. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Fenotipik Yöntemler

Bugün bilinen bakterilerin çoğu 19–20. yüzyıllar arasında tanımlanmış, fenotipik özellikleri belirlenmiştir. Bir bakteride özgül olarak bulunan fenotipik özellik, suşun yayılımı hakkında bilgi verebilmektedir. Ortak fenotipik özelliklere sahip suşlar söz konusu olduğunda ek olarak; biyotiplendirme (biyokimyasal reaksiyonlar, çevre şartlarına tolerans), antibiyotik duyarlılıkları, başta ağır metaller olmak üzere çeşitli kimyasal maddelere duyarlılıkların belirlenmesi, faj ve bakteriyosin tiplendirmesi, serotiplendirme, protein elektroforezleri (tam hücre proteini, immunoblotting, multilokus enzim elektroforezi, zimotiplendirme) gibi

yöntemler kullanılmaktadır. *M. tuberculosis* suşlarının ayırımında kullanılan faj tiplendirmesi sadece birkaç farklı tipi tanımlayabilmesi ve teknik olarak çeşitli sorunlar içermesi nedeniyle sınırlı kalmıştır. Serotiplendirme ise *M. tuberculosis* kompleksi içerisindeki suşların farklılıklarını saptayamamaktadır (47).

Mikroorganizma üzerindeki çevresel seçici baskılar, değişken antijenik yapı, antibiyotik tedavilerinin direnç gelişimine etkileri, fenotipik özelliklerin farklı genlerde kodlanabilmesi, ticari olarak bulunmayan bazı ayıraçların gereksinimi, bir tür içerisindeki suşun ayırteci özelliklerinin yetersiz olması, fenotipik yöntemlerin duyarlılığını azaltmaktadır. Bu nedenle, *M. tuberculosis* suşlarının basit ve hızlı tiplendirilmesi için genotipik yöntemler denenmektedir (4).

4.5.2. Mikobakterilerin Tiplendirilmesinde Genotipik Yöntemler

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

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

4.5.2.2. PZT bazlı tiplendirme yöntemleri: PZT, 50–2000 baz çiftli DNA veya RNA'nın yarı otomatik sistem içerisinde birkaç saatte bir milyondan daha fazla çoğaltılmasını sağlayan

ardışık üç basit tepkimenin (denatürasyon, bağlanma, uzama) bir döngü halinde yinelenmesidir. Duyarlılığı, özgüllüğü yüksek ve hızlı bir yöntem olması, mikroorganizmaları doğrudan tiplendirilebilmesi yararlı özellikleridir. Buna karşın, kontaminan DNA'nın çoğaltılması ya da epidemi ile ilgisi bulunmayan mikroorganizmaların benzer nükleik asit sıralarının tanımlanmasına bağlı yalancı pozitif sonuç vermesi, primerlerin sadece hedeflenen nükleik asit dizisini tanımlaması ve DNA kaybı nedeniyle yalancı negatif sonuçlar başlıca olumsuz özellikleridir. Geleneksel PZT'nin sahip olduğu dezavantajları ortadan kaldırmak için nükleik asit tabanlı yeni moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiştir (47).

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

4.5.2.2.2. Rasgele çoğaltılan polimorfik DNA [Random amplified polymorphic DNA (RAPD) = *Arbitrarily Primed* PZT (AP-PZT)]: Düşük ısılarda kromozomal DNA dizilerine bağlanan 9–10 bazdan oluşan rasgele primerlerin kullanıldığı bir yöntemdir. Bu rasgele primer bölgeleri, yerleşim ve sayıları yönünden bir bakteri türünün değişik suşlarında farklılık göstermektedir. Sonuçta agaroz jelde elektroforez ile her suş için karakteristik bantlar ortaya çıkmaktadır (47).

4.5.2.3. DNA dizi analizi: Özel bir bölgenin tüm dizisi çıkarılır. DNA dizi analizinde, hedeflenen gen bölgesi için kullanılacak primerler belirlenerek hedef nükleik asit PZT ile çoğaltılır. Elde edilen PZT ürünü saflaştırıldıktan sonra poliakrilamid jel üzerinde yürütülerek gen dizisi içerisindeki bazlar tanımlanır. Otomatize sekanslama cihazları ve bilgisayarlı sistemlerle PZT ürününün dizisi saptanır. Adenin (A), C, G, timin (T) bazları için dört farklı floresan boya kullanılarak farklı dalga boylarında ışımaların büyüklükleri ve tipleri bilgisayar yardımıyla bir elektroferogram üzerinde gösterilmektedir. DNA dizi analizleri hem mutasyonel değişimlerin saptanması hem de suşların genetik özelliklerinin ortaya çıkarılmasında çok etkin bir yöntemdir. Ancak özel ve pahalı ekipman gerektirmesi bu yöntemin rutinde kullanılmasını zorlaştırmaktadır (47).

4.6. *Mycobacterium tuberculosis*'in Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler

Moleküler tekniklerin gelişmesiyle, *M. tuberculosis*'in filogenetik özellikleri ve yayılma dinamikleri daha iyi anlaşılabilir hale gelmiştir. Moleküler tiplendirme ile tüberkülozun rekürrensi, sekonder enfeksiyonun reenfeksiyon veya reaktivasyon olup olmadığı ve bir hastada aynı anda iki veya daha fazla suş ile enfeksiyonun varlığı ortaya konulabilmektedir.

Böylece tüberküloz kontrol ve tedavi protokollerinin etkinliği araştırılabilmektedir. Salgınların araştırılmasında ve laboratuvar içi çapraz bulaşın tanımlanmasında büyük yararlar elde edilmektedir. Bu yöntemlerle belirli bir coğrafik alan içindeki bulaşın analizi yapılabilmektedir (9).

Moleküler tiplendirme yöntemleriyle çoklu ilaç direnci olan suşların saptanması, kaynak ve yayılma yolları gösterilebilmektedir. *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesi, bir toplum veya aile içindeki enfeksiyonun kaynağı, yayılması ve direnç kazanmış olan suşların erken saptanması gibi önemli epidemiyolojik soruların yanıtını verebilir. Moleküler yöntemler, tüberkülozun yayılmasını etkileyen faktörlerin daha iyi anlaşılmasında ilave araçlar olarak kullanılabilir. Risk faktörlerinin belirlenmesi ve bölgesel kontrol programlarının değerlendirilmesi, daha rasyonel ve etkili kontrol önlemlerinin alınabilmesine olanak sağlayabilir. Eğer bir toplumdaki tüberküloz vakalarının önemli bir kısmı yeni oluşmuş bir bulaş sonucunda meydana gelmiş ise, bu durum o toplumda tüberkülozun önlenmesi için alınmış olan korunma tedbirlerinin yetersizliğini göstermektedir (5,9).

Bir tiplendirme yönteminden beklenen, suşa özel genetik profili ortaya koyabilmesidir. Bu profiller parmak izi “fingerprints” olarak adlandırılır. İki veya daha fazla suş aynı veya çok benzer profil oluşturuyor ise bunlar aynı küme (cluster) içinde olarak adlandırılır. Farklı hastalardan izole edilen fakat aynı genetik profili gösteren izolatlar, büyük olasılıkla epidemiyolojik olarak ilişkilidir. Bu durum genellikle hastalar arasındaki yeni bulaşmayı yansıtmaktadır (9).

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

1. İnsersiyon sekansları (*Insertion sequence - IS*): IS986, IS987, IS1081, IS6110
2. Major Polimorfik Düzenli Yineleyen Elemanlar (*Major Polymorphic Tandem Repeats - MPTR*)
3. Polimorfik GC-zengin Sekanslar (*Polymorphic GC-rich Sequences - PGRS*)
4. Değişken Sayılı Düzenli Yineleyen Elemanlar (*Variable Number Tandem Repeats - VNTR*)
5. Direkt Yineleyen Elemanlar (*Direct Repeats - DR*)

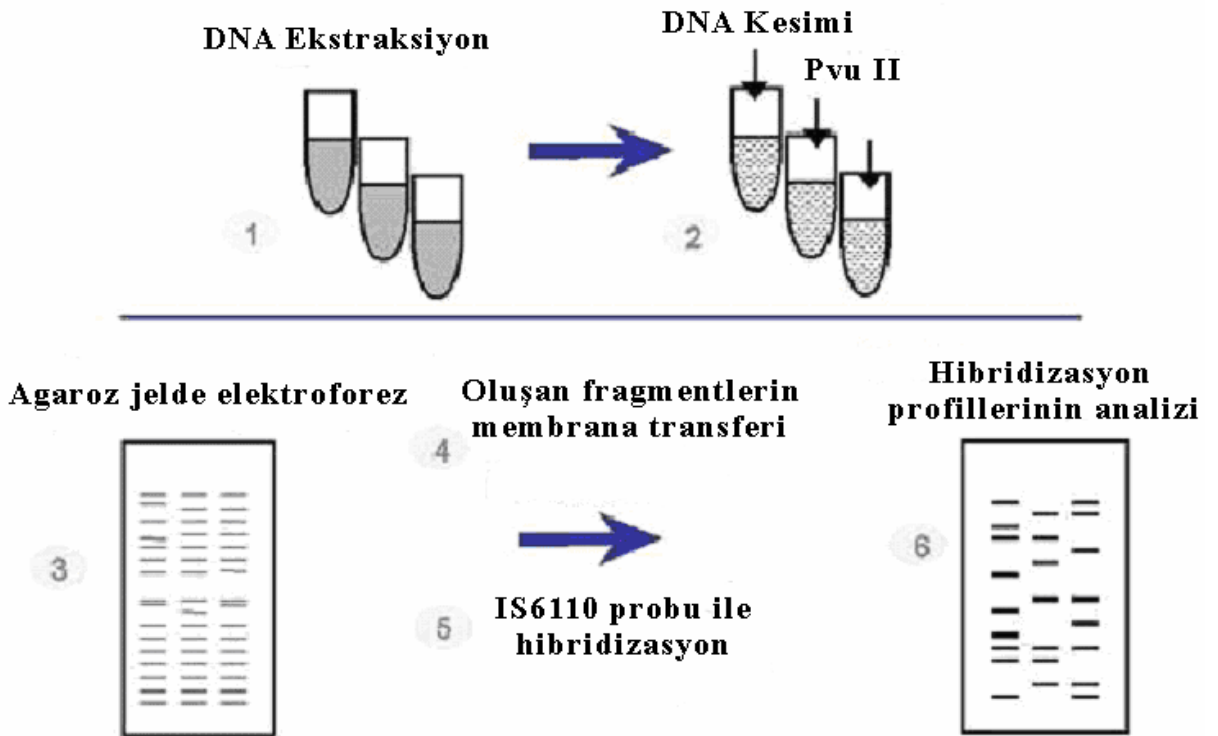
Yineleyen DNA sekanslarının *M. tuberculosis* epidemiyolojisinde kullanılması 1980’li yılların sonlarında yapılan çalışmalarla başlamıştır (49).

4.6.1. RFLP: RE'ler çiftsarmal DNA'yı çok özgül olarak belirli bölgelerden keserek parçalara ayırmaktadır. DNA, bir veya daha fazla RE ile kesildikten sonra, agaroz jel elektroforezinde bantların ayrışması ve böylece DNA parçalarının büyüklüğü ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe RFLP adı verilir. Yöntem genel olarak DNA'nın izolasyonu, RE ile kesim, elektroforez, jelin görüntülenmesi ve yorumlanması aşamalarından oluşur. Bu yöntemde kullanılacak enzimlerin seçiminde genomik DNA'yı en fazla 20 noktadan kesecek RE seçilmelidir. DNA'nın küçük parçalara ayrılmasıyla oluşan çok sayıda bant, sonuçların yorumlanmasını güçleştirmektedir. Bu yöntem temel alınarak çok sayıda yeni metot geliştirilmiştir (9,47).

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

4.6.1.1.1. IS6110-RFLP: *M. tuberculosis*'de bulunan tekrarlayan bölgelerden birisini IS (İnsersiyon sekansları - *Insertion sequences*) oluşturur. Bu güne kadar birçok yerleşim elementi tanımlanmıştır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı IS6110'dur. 1324 baz çifti uzunluğunda olan IS1081 de *M. tuberculosis* komplekste bulunmaktadır. Çoğunlukla değişmeden her genomda 5–7 kopya halinde bulunmaktadır. Transpozisyonel aktivitesinin az olması ve kopya sayısının IS6110'dan daha düşük olması nedeniyle sınırlı DNA polimorfizmi oluşturur, epidemiyolojik çalışmalardaki kullanımını sınırlıdır. IS1547 ve IS-like element her genomda bir veya iki kopya halinde bulunmaktadır. IS6110 ile kıyaslandığında, IS1547-RFLP'nin ayırım gücü düşüktür. IS6110 enterobakteriyel IS3 ailesine ait 1361 baz çiftlik bir yerleşim elementidir. *M. tuberculosis* kompleksinde yeri ve sayısı (0–25 kopya) değişkenlik göstermekle birlikte çoğunlukla 8–15 kopya halinde bulunur. Bu yöntem *M. tuberculosis* tiplendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Burada öncelikle bakteriyel kültürden DNA elde edilmekte ve kromozomal DNA'daki IS6110 bölgeleri *PvuII* enzimi ile kesilmekte, ardından elektroforez yapılarak bantların ayrışması sağlanmaktadır. Alkali ortamda denatüre edilen jeldeki DNA, southern blotting yöntemi ile naylon membrana aktarılır. IS6110 içeren parçaları görüntülemek için IS6110 DNA sekansına komplementer 521 baz çiftlik DNA dizisine sahip peroksidaz işaretli prob, hibridizasyon tamponuna

eklenir. IS6110 probu ile hibridize olan PvuII ile kesilmiş restriksiyon parçaları kemiluminesans reaksiyon ile görüntülenirler. Elde edilen ısıma x-ray film üzerine aktarılarak sonuçlar yorumlanır (Şekil 2). Yöntemin dezavantajı, kültürde üremeye gereksinim duyulması, uzun zaman alması, deneyimli personel ihtiyacı ve en önemlisi de kopya sayısı beş ve daha az olan suşlarda ayırım gücünün yetersiz kalmasıdır. Ayrıca IS6110 kopyası bulunmayan suşlarda sonuç alınamamaktadır (50-52). IS6110-RFLP tiplendirmesinin hemen sonrasında, bazı *M. tuberculosis* suşlarının ve epidemiyolojik olarak bağlantılı izolatların üreme dönemlerinde kaybedilen IS elemanı transpozonları, DNA parmak izlerinde kaymalara yol açmıştır (53). Bu bulgu, bu yöntemin TB olgularının epidemiyolojik araştırmalarında güvenilirliği açısından tartışma yaratmıştır.



Şekil 2. IS6110-RFLP yönteminin şematik görünümü (54).

4.6.1.1.2. PGRS-RFLP: *Polymorphic GC-rich sequence* (PGRS), tüberküloz kompleksinde en çok bulunan tekrarlanan elementtir. Çok sayıda, 96 baz çifti uzunluğunda G + C'ce zengin uyum diziliminin birbiri arkasına sıralanmış tekrarlarını (*tandem repeats*) içerir. *M. tuberculosis* kompleksi ve diğer mikobakterilerde yaklaşık 30 kadar tekrarlanmaktadır. Bu yöntemde, üzerinde polimorfik GC'den zengin dizi (PGRS) bulunduran ve bir rekombinant plazmit olan

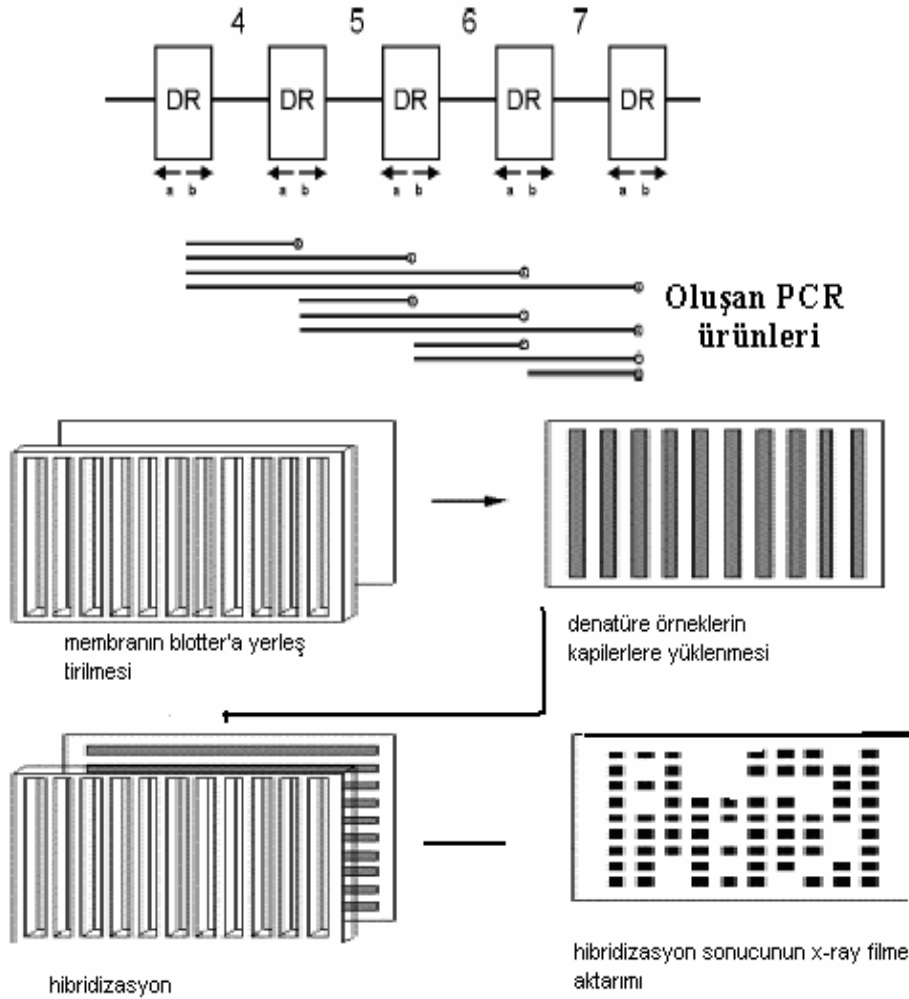
pTBN12'nin yerleştirilmesiyle hazırlanan prob kullanılmaktadır. IS6110 kopyası olmayan veya düşük sayıda kopya bulunduran *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesinde ikincil yöntem olarak kullanılmaktadır. pTBN12 parmakizi yönteminde; kromozomal DNA *AluI* enzimi ile kesildikten sonra, agaroz jel elektroforeziyle DNA parçalarının ayrıştırılması yapılmaktadır. Naylon membrana transfer edilen DNA parçalarının gösterilmesinde, kemilüminesan veren maddeyle işaretli prob (pTBN12) kullanılmaktadır. pTBN12; *E. coli* DH_{5α}'dan izole edilmekte, *EcoRI* ve *HindIII* ile kesildikten sonra yerleştirilen kısım saflaştırılarak prob olarak kullanılmaktadır. Bu prob, *M. tuberculosis* ve diğer mikobakterilerde, her genom üzerinde yaklaşık 30 kez yinelenen PGRS ile hibridizasyona girmektedir (55). Bu yöntemin tekrarlanabilirliği %100 olarak bulunmuştur. Ayrım gücü de yüksektir. IS6110-RFLP ile aynı dezavantajlara sahiptir. İlave olarak çok fazla sayıda bant elde edilmekte ve bunun sonucu olarak verilerin değerlendirilmesinde sıkıntı oluşmaktadır.

4.6.2. Spoligotipleme: *M. tuberculosis* kompleksinde 36 baz çiftlik doğrudan tekrarlayan (*direct repeat* - DR) bölgeler bulunmaktadır. DR bölgesi olarak adlandırılan tek bir genomik bölgede bulunan bu yapıların arasında 35–41 baz çifti uzunluğunda suşa özgü boşluk oluşturan diziler (*spacer*) bulunmaktadır. Hem DR'lerin sayısı hem de boşlukların varlığı suşlar arasında farklılık gösterir. DR'ler arasında 94 farklı *spacer* tanımlanmıştır. *M. bovis* BCG aşısı suşu (P3) ve *M. tuberculosis* H37Rv suşlarının DR bölgelerinde bulunan ayırıcı boş bölge sekansları baz alınarak 43 sentetik oligonükleotid tasarlanmış ve bu oligonükleotidler bir DNA membranının üzerine çizgisel olarak yerleştirilmiştir. Araştırılan *M. tuberculosis* kompleks suşunun DR bölgesindeki 43 ayırıcı boş bölgenin incelenmesi için, bu suşun tüm DR bölgesi PZT ile çoğaltılmaktadır. Farklı büyüklükteki PZT ürünleri, sentetik oligonükleotitleri dik olarak kesecek sıralar halinde membran üzerine aktarılmaktadır. DR primerlerinin bir tanesi biotin ile işaretlenerek streptavidin-peroksidaz konjugatı ve substrat yoluyla sentetik oligonükleotidlerin üzerindeki hibridizasyon membran üzerinde kemilüminesans yöntemi ile gösterilebilmektedir. Ayırıcı dizilimlerin varlığı veya yokluğu dijital olarak gözlenmektedir. Ayırıcı dizilimler suşlar arasında değişim göstermektedir ve hibridizasyon membranının sabitleşme yüzeyinde leke şeklinde görülmektedir. (Şekil 3). Bu membran en az 20 kere kullanılabilir. Bu yöntemle *M. bovis*, *M. microti* ve *M. canettii* suşları kolayca ayrılabilir. Basit hızlı ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Sonuçlar basit bir bilgisayar programında dijital olarak kodlanarak değerlendirilebilmektedir (52,56).

Bu yöntem *M. tuberculosis*'in tiplendirilmesinde IS6110-RFLP'den sonra en yaygın olarak kullanılmaktadır (51,52). Yüksek kopya sayılı suşlar analiz edildiğinde

spoligotiplemenin ayırım gücü IS6110-RFLP'den daha düşük, düşük kopyalı suşların değerlendirilmesinde ise üstündür. Spoligotiplendirmede IS6110-RFLP'ye göre daha fazla korunmuş genetik bilgi kullanıldığından, bu yöntem, *M. tuberculosis* kompleks izolatlarının takson veya alttürle ayırımında yararlıdır. Spoligotiplendirmenin IS6110-RFLP'den en belirgin üstünlüğü, tek bir deney içerisinde *M. tuberculosis* kompleksinin hem araştırılması hem de tiplendirilmesinin yapılabilmesidir (57). Ayrıca, canlılığını yitirmiş dokulardan, EZN boyalı preparatlardan ve parafinle işlenmiş örneklerden çalışılabileceği gösterilmiştir (58).

Bununla birlikte, spoligotiplendirmenin IS6110-RFLP tiplendirmesinin yerini alma konusu kuşkuyla bulunmaktadır. IS6110-RFLP tiplendirme paternlerinde belirgin farklılıklar gösteren bazı *M. tuberculosis* suşları benzer spoligopatrenler göstermektedir (59). Ayrıca, spoligotiplendirmenin *M. bovis* izolatlarındaki ayırım gücü PGRS veya DR-bazlı RFLP tiplendirmesine göre daha düşüktür (60). Buna karşın spoligotiplendirmenin, epidemiyolojik analizlerde uygun bir tarama yöntemi olduğu kabul edilmektedir.

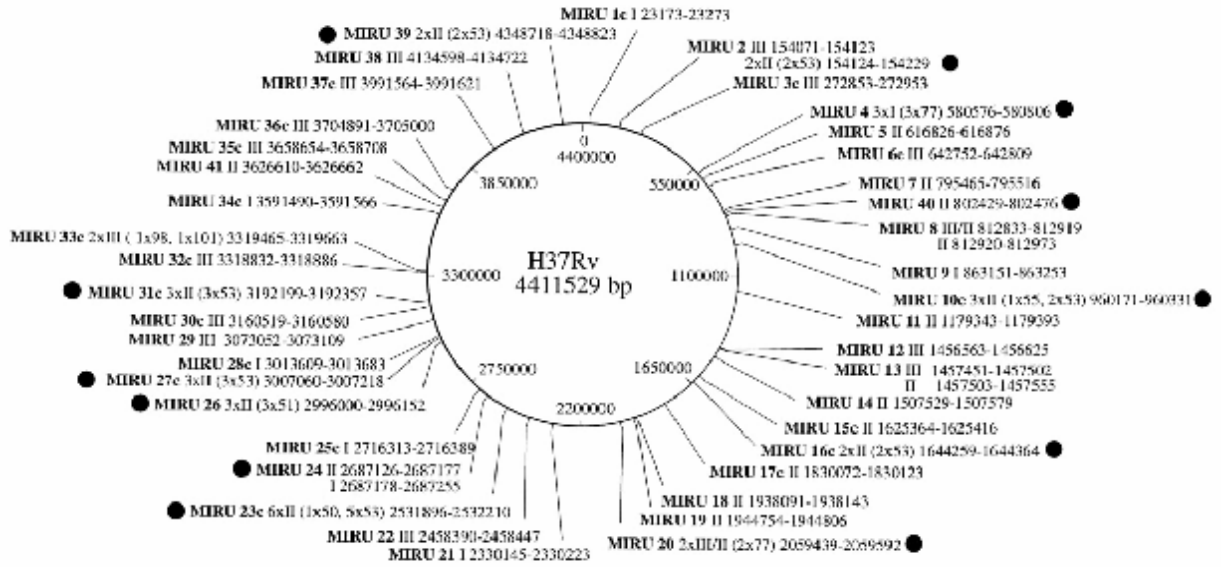


Şekil 3. Spoligotipleme yönteminin şematik görünümü (61)

4.6.3. Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU) – Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR):

Değişik sayıda sıralı tekrarlar içeren küçük uyduların (minisatellites) polimorfizmine dayalı bir yöntemdir. Bu bölgeler PZT bazlı olan bu tiplene yönteminin temelini oluşturur. Sıralı tekrar bölgelerinden (*tandem repeat loci*) elde edilen PZT ürünlerinin dizi analizi yapılarak sıralı tekrarların sayısı ve bunların her iki yanında lokalize olmuş DNA parçalarının büyüklüğü belirlenmektedir. *M. tuberculosis* genomunda böyle 41 farklı değişebilen sıralı tekrarlar (*variable tandem repeats*) tanımlanmış ve bunlara MIRU adı verilmiştir (Şekil 4) Genomda bağımsız halde bulunan 12 farklı bölgedeki tekrarlar değerlendirilir. Tekrarlar 52–77 oligonükleotid büyüklüğündedir. PZT ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülür, her bölgedeki MIRU tekrarları bant büyüklüklerine göre değerlendirilir. Sonuçlar 12 rakamlı dijital formata çevrilir.

Ayrım gücü yüksek, tekrarlanabilir ve uygulaması kolay, çok merkezli çalışmalara uygun ve otomatize edilebilir bir yöntemdir (5,9,10). Tüberkülozun küresel epidemiyolojik sürveyansı için uygundur. PZT bazlı yöntemler gibi aynı gün içerisinde sonuç verebilmektedir. IS6110-RFLP ve spoligotipleme ile kıyaslandığında, MIRU-VNTR tiplene daha fazla ayırıcı profil oluşturmaktadır. Bu yöntemler, kabul edilebilir uluslararası standart protokolün adaptasyonunu takiben, yakın gelecekte IS6110'u gölgede bırakacaklardır (5,9,10).



Şekil 4. *M. tuberculosis* genomundaki 41 MIRU bölgesi (w.w.w.aphl.org.programs /infectious_diseases/shinnick.pdf)

4.6.4. Exact Tandem Repeat (ETR) - VNTR: VNTR içeren 6 bölgenin (ETR bölgeleri A-F) çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir. ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E bölgelerine özel birer çift primerle çoğaltılmakta ve agaroz jel elektroforezinde ürünün büyüklüğü ve her bölgedeki ETR sayısı belirlenmektedir. Ayrım gücü MIRU-VNTR tiplene yönteminden daha düşüktür (5,9).

4.6.5. 16S ve 23S rRNA: 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin arasında kalan ve suşlar arasında farklılık gösteren bölgelerin çoğaltılması ve sonrasında RE ile kesilerek agaroz jel elektroforezinde oluşan paternlerin belirlenmesi şeklinde uygulanır. Yöntemin tekrarlanabilirliği ve ayrım gücü diğer yöntemlerle kıyaslandığında yetersiz bulunmuştur (9).

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

Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde ortaya çıkan bir mutasyon, suşa özgü bant polimorfizmin oluşmasına neden olur. Elektroforez sonucu ortaya çıkan her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılarak sonuçlar yorumlanır. Uygulama kolaylığı, kısa sürede sonuç alma ve çok sayıda örnek çalışılmasına imkan tanınması nedeniyle geniş kullanım alanı bulmuştur. Ancak en önemli dezavantajı laboratuvarlar arası standardizasyonunun sağlanmamış olmasıdır (9,62). Amplifikasyonun erken döngülerindeki tepkime değişimleri, primer / kalıp DNA oranı, kalıp DNA'nın saflığı ve "thermal cycler" cihazında farklı ısı profilleri nedeniyle yinelenebilirlik azalmaktadır. Bu nedenle, yöntemin güvenilirliği ve kullanılabilirliği tartışma konusu olmuş ve bu yöntemle ilgili ileri çalışmalara gereksinim olduğu belirtilmiştir (62).

4.6.7. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE): Bu yöntemde genomik DNA, yüksek molekül ağırlıklı parçalar oluşturan ve kesim alanları sınırlı olan çeşitli RE ile (*EcoRI*, *AseI*, *DraI*, *SpeI* ve *XbaI*) kesimin ardından belirli aralıklarla yönü değiştirilen uzun süreli elektrik akımına tabi tutularak bantların ayrışması sağlanır. Etidyum bromür ile boyanan jelde her bir izolata ait tüm bakteri genomunun RE paternleri belirlenir. Birçok bakteri için salgınların

araştırılmasında ve popülasyon bazlı çalışmalarda kullanılan moleküler tiplendirmede altın standart kabul edilmektedir. Sınırlı sayıda bant oluşturması ve buna bağlı olarak ayırım gücünün yetersiz olması *M. tuberculosis*'in epidemiyolojik çalışmalarında kullanımını kısıtlamıştır (9,55).

4.7. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi Alttürlerinin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Yeri

İnsanlarda TB oluşmasına, sadece *M. tuberculosis* değil, *M. tuberculosis* kompleksi içerisindeki diğer bakteriler de neden olmaktadır. *M. tuberculosis* gibi, *M. africanum* da başlıca primatları enfekte etmektedir. Biyokimyasal olarak *M. africanum*, *M. tuberculosis* ile *M. bovis* arasında bulunmakta ve insanlarda *M. tuberculosis*'le aynı semptomlara neden olmaktadır. *M. tuberculosis* ve *M. bovis*'ten ayırdetmek için kullanılan testlerin değişken sonuçlar vermesi *M. africanum*'un farklı bir tür olması konusunda kuşku yarattığı, DNA parmak izi yöntemlerinin geliştirilmesi ile açıklığa kavuşmuştur (63).

IS6110-RFLP tiplendirmesi ile *M. tuberculosis*'in zoonotik yayılımı ortaya çıkarılmıştır. Önceleri küçük kemiricilerin basili olarak bilinen *M. microti*'nin, son zamanlarda, DNA parmak izi yöntemlerinin gündeme gelmesiyle, insanlarda ağır TB formlarına neden olabileceği gösterilmiştir. Tanımlanan *M. microti* suşlarının karakteristik IS6110-RFLP profillerine ve spoligopaternalere sahip olduğu bulunmuş ve insanlarda *M. microti*'den kaynaklanan TB araştırılabilmiştir. Tüm *M. microti* enfeksiyonları, klasik akciğer TB veya hastalığın yaygın formları şeklinde görülmüşlerdir. *M. microti* tanısı, bu mikroorganizmanın çok yavaş üremesi nedeniyle oldukça sınırlıdır. Bu patojen katı besiyerinde 6–12 haftada, sıvı besiyerlerinde ise daha kısa sürede üreyebilmektedir. İlk izolasyonu katı besiyerinde uygulanan çoğu laboratuvarında, kültürler bu bakterinin üremesinin gözleneceği zamana kadar inkübe edilmemektedir. Bu nedenle, mikroskopik olarak pozitif, fakat kültür negatif sonuçlar görülebilmekte, özellikle kemirici prevalansının yüksek olduğu bölgelerde sanıldığından daha fazla *M. microti* enfeksiyonu olduğu düşünülmektedir (64).

M. tuberculosis kompleksi içerisinde tanımlanan *M. canetti* en yüksek evrimsel genetik değişkenliği gösteren alttürüdür. Bu bakteri, ilk kez Somali'li genç bir hastadan izole edilmiş, S tipi koloni morfolojisi ve diğer *M. tuberculosis* kompleksi bakterilerinden daha kısa zamanda üremesi ile dikkati çekmiştir. IS1081-RFLP ile yaklaşık 2000 *M. canettii* izolatında 5–7 bant saptanmıştır. Buna karşın, birbirinden farklı ve bağımsız kaynaklı üç *M. canettii* suşunda ise sadece bir bant gözlenmiştir (65).

M. tuberculosis ve *M. africanum*'un aksine, *M. bovis* çeşitli evcil ve vahşi hayvanlardan oluşan geniş bir konakçı yelpazesinde enfeksiyonlara neden olmaktadır (66). *M. bovis*, diğer *M. tuberculosis* kompleksi alttürlerinden biyokimyasal testler ve koloni morfolojisi ile ayrılabilir. Spoligotiplendirmede, çoğu *M. bovis* suşu karakteristik paternler göstermektedir (4,60). Bununla birlikte, biyokimyasal testlerle *M. bovis* olduğu düşünülen bazı suşlarda, bunların dışında farklı paternler de saptanmıştır (4).

M. bovis enfeksiyonları, klasik olarak, enfekte ineklerden insanlara çiğ süt yoluyla geçmekte ve genellikle insandan insana bulaş görülmemektedir. *M. bovis* enfeksiyonları, *M. tuberculosis* enfeksiyonlarından daha sık olarak solunum dışı bölgelerde görülmektedir. IS6110-RFLP tiplendirmesi *M. bovis* yayılımını araştırmak için en uygun yöntem olmasa da gruplandırılmasında kullanılabilir (60,66). İneklerden ve insanlardan izole edilen *M. bovis* izolatlarının büyük bir bölümü sabit bir genomik pozisyonda sadece bir IS6110 kopyası içermektedirler (60,67). Diğer evcil ve vahşi hayvanlardan soyutlanan izolatlarda ise, daha yüksek sayılarda IS6110 elemanı saptanmıştır (4,67). *M. bovis* izolatları için PGRS-RFLP tiplendirmesinin ayırım gücünün yüksek olduğu görülmektedir (4,60). Son zamanlarda, *M. bovis* tiplendirmesinde, spoligotiplendirme ve diğer DNA parmak izi yöntemleri kullanılmaktadır (4,67).

Canlı BCG aşısı, ateniye *M. bovis* suşundan elde edilmektedir. Moleküler yöntemlerle bu suşların da TB enfeksiyonuna neden olduğu kanıtlanmıştır. Karakteristik IS6110 ve IS1081 paternleri BCG izolatlarının tanımlanmalarını sağlamaktadır (7). Hastalardan soyutlanan *M. bovis* BCG izolatlarının tanımlanmasıyla, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde yaygın TB formlarına neden olabileceği gösterilmiştir. Önceleri, BCG kaynaklı TB enfeksiyonlarının ateniye bakterilerle aşılardan uzun bir süre sonra, endojen reaktivasyonlara bağlı olduğu düşünülmekteydi. Son yıllarda, iyatrojenik yol olarak adlandırılan diğer olası enfeksiyon kaynağı gündeme gelmiştir. Günümüzde mesane kanserinin tedavisinde sıklıkla kullanılan çok sayıda canlı bakteri içeren liyofilize BCG, sıklıkla diğer hastalara uygulanacak kemoterapötiklerle aynı güvenlik kabinlerinde hazırlanmaktadır. Kanser tedavisi uygulanan hastalar için kullanılan BCG bakterilerinin DNA parmak izleri ile hastalardan izole edilenler karşılaştırıldığında bazı enfeksiyonların hastane eczanelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir (68).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Çalışma Grubu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na Haziran 2002 ile Temmuz 2006 tarihleri arasında başvuran aktif TB ön tanılı hasta örneklerinden soyutlanan ve *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan 152 farklı hastaya ait izolat ve H37Rv çalışmaya alındı.

5.2. *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarının Moleküler Tiplendirilmesi

M. tuberculosis izolatları için kromozomal DNA izolasyonu, MIRU-VNTR ve ETR-VNTR gen bölgelerine göre tiplendirme; uluslararası, standardize edilmiş protokollerle yapıldı (12,69,70).

5.2.1. Mikobakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

Mikobakterilerden yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA izole edildi.

Gereçler:

1. EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) stok solüsyonu (500 mM)

Na₂EDTA (Sigma E5134) 18,6 g

Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH'ı ayarlamak için 100 mM'lık NaOH kullanıldı.

Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı.

2. Tris-EDTA (TE 1X) pH=8

Tris-HCL (Sigma T5941) 1,576 g

500 mM EDTA 2 mL

Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı

Yöntem:

1. Güvenlik kabininde *M. tuberculosis* izolatına ait kültürden steril bir eküvyonla koloniler toplanarak, vidalı kapaklı ependorfta bulunan 1 mL serum fizyolojik içerisine alındı, 11.000 g de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım atıldı.
2. Çökelti üzerine 250 µL 1X TE tamponu eklenerek vortekslendi.

3. 11.000 g de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
4. Çökelti üzerine 250 µL 1X TE tamponu eklenerek, 95 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
5. 11.000 g de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant kısım DNA ekstraktı olarak -20 °C’de saklandı.

5.2.2. MIRU-VNTR ve ETR-VNTR gen bölgelerinin PZT ile çoğaltılması

M. tuberculosis izolatlarına ait kromozomal DNA’dan MIRU-VNTR ve ETR-VNTR gen bölgeleri PZT ile çoğaltılarak elde edildi.

Gereçler:

1. Mikobakteriyel genomik DNA
2. 25 mM MgCl₂
3. dH₂O
4. 2 mM dNTP
5. 10X tampon
6. %10 DMSO
7. Hot start taq DNA polimeraz
8. Primerler

MIRU-2-ileri 5’- TGG ACT TGC AGC AAT GGA CCA ACT - 3’

MIRU-2-geri 5’- TAC TCG GAC GCC GGC TCA AAA T - 3’

MIRU-4-ileri 5’- GCG CGA GAG CCC GAA CTG C - 3’

MIRU-4-geri 5’- GCG CAG CAG AAA CGC CAG C - 3’

MIRU-10-ileri 5’- GTT CTT GAC CAA CTG CAG TCG TCC - 3’

MIRU-10-geri 5’- GCC ACC TTG GTG ATC AGC TAC CT - 3’

MIRU-16-ileri 5’- TCG GTG ATC GGG TCC AGT CCA AGT A - 3’

MIRU-16-geri 5’- CCC GTC GTG CAG CCC TGG TAC - 3’

MIRU-20-ileri 5’- TCG GAG AGA TGC CCT TCG AGT TAG - 3’

MIRU-20-geri 5’- GGA GAC CGC GAC CAG GTA CTT GTA - 3’

MIRU-23-ileri 5'- CTG TCG ATG GCC GCA ACA AAA CG - 3'
MIRU-23-geri 5'- AGC TCA ACG GGT TCG CCC TTT TGT C - 3'
MIRU-24-ileri 5'- CGA CCA AGA TGT GCA GGA ATA CAT - 3'
MIRU-24-geri 5'- GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA - 3'
MIRU-26-ileri 5'- TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC -3'
MIRU-26-geri 5'- CAT AGG CGA CCA GGC GAA TAG - 3'
MIRU-27-ileri 5'- TCG AAA GCC TCT GCG TGC CAG TAA - 3'
MIRU-27-geri 5'- GCG ATG TGA GCG TGC CAC TCA A - 3'
MIRU-31-ileri 5'- ACT GAT TGG CTT CAT ACG GCT TTA - 3'
MIRU-31-geri 5'- GTG CCG ACG TGG TCT TGA T - 3'
MIRU-39-ileri 5'- CGC ATC GAC AAA CTG GAG CCA AAC - 3'
MIRU-39-geri 5'- CGG AAA CGT CTA CGC CCC ACA CAT - 3'
MIRU-40-ileri 5'- GGG TTG CTG GAT GAC AAC GTG T - 3'
MIRU-40-geri 5'- GGG TGA TCT CGG CGA AAT CAG ATA - 3'
ETR-A-ileri 5'- AAA TCG GTC CCA TCA CCT TCT TAT - 3'
ETR-A-geri 5'- CGA AGC CTG GGG TGC CCG CGA TTT - 3'
ETR-B-ileri 5'- GCG AAC ACC AGG ACA GCA TCA TG - 3'
ETR-B-geri 5'- GGC ATG CCG GTG ATC GAG TGG - 3'
ETR-C-ileri 5'- GTG AGT CGC TGC AGA ACC TGC AG - 3'
ETR-C-geri 5'- GGC GTC TTG ACC TCC ACG AGT G - 3'

Yöntem:

1. PZT Karışımı (amplifikasyon miksi) aşağıda belirtilen şekilde her primer seti için ayrı hazırlandı;

dH ₂ O	MIRU 10, 16, 31, 2, 23 ve 39 primerleri için	12,5 µL
	MIRU 4, 26, 40, 20, 24 ve 27 ile tüm ETR primerleri için	12,0 µL
25 mM MgCl ₂	MIRU 10, 16, 31, 2, 23 ve 39 primerleri için	1 µL

MIRU 4, 26, 40, 20, 24 ve 27 ile tüm ETR primerleri için	1,5 µL
2 mM dNTP	2,0 µL
10X tampon	3,0 µL
% 10 DMSO	2,5 µL
Primer 1	1,0 µL
Primer 2	1,0 µL
Hot start taq DNA polimeraz	1,0 µL
Toplam hacim	24 µL

2. Çalışılacak örnek sayısı kadar hazırlanan karışım 0.5mL'lik tüplerin her birine 24 µL dağıtıldı.
3. Üzerlerine 1µL ekstrakte DNA eklendi.
4. *Thermal cycler* aletine (Techne TC-412) yerleştirildi. *Thermal cycler* aletinde aşağıdaki siklus programı uygulandı.

95 °C de 15 dakika ilk denatürasyon

94 °C de 60 saniye	}	40 siklus
59 °C de 60 saniye		
72 °C de 90 saniye		

72 °C de 10 dakika son uzatma

5. Reaksiyon 4°C'de durduruldu. Amplifikasyon ürünü saptama basmağının uygulanacağı zamana kadar 2-8°C'de saklandı.

5.2.3. Jel elektroforez

M. tuberculosis suşlarına ait kromozomal DNA'dan PZT ile çoğaltılan MIRU ve ETR gen bölgeleri gösterildi.

Gereçler:

1. Tris-Borik asit-EDTA (TBE 0,5X)

Trizma base (Sigma T1503) 27 g

Borik asit (Sigma B6768) 13,75 g

EDTA (AppliChem A2937) 1,9 g

500 mL distile su içerisinde eritildi ve 5000 mL'ye tamamlandı.

2. Etidyum bromit 1000X solüsyonu (EtBr) (5 mg/mL)

Etidyum bromit (Sigma E8751) 0,5 g

Distile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Işıktan korumak için aliminyum folyo ile kaplandı, oda sıcaklığında saklandı.

3. Jel yükleme tamponu (Fermentas #R0629) -20 °C'de saklandı

4. 100 bç DNA ladder (Fermentas SM0241) -20 °C'de saklandı.

5. Agar

Yöntem:

1. %2' lik agaroz jel (%2' lik agaroz jel = 2.6 g agaroz, 130 mL 0,5 X TBE, 6 µL EtBr), 20 x 25 cm'lik elektroforez tankı kullanılarak döküldü.
2. Katılaşması için 20 dk beklendi.
3. İlk kuyucuğa standard belirleyici olarak 100 bç DNA ladder yüklendi.
4. İkinci kuyucuktan itibaren 2 µL jel yükleme tamponu ile homojen olarak karıştırılan her primer için ayrı 10 µL PZT ürünü yüklendi.
5. Son kuyucuğa standart belirleyici olarak 100 bç DNA ladder yüklendi.
6. 45 dk. 130 voltta elektroforez yapıldı.
7. UV transluminatör üzerinde jel fotoğraflandı.

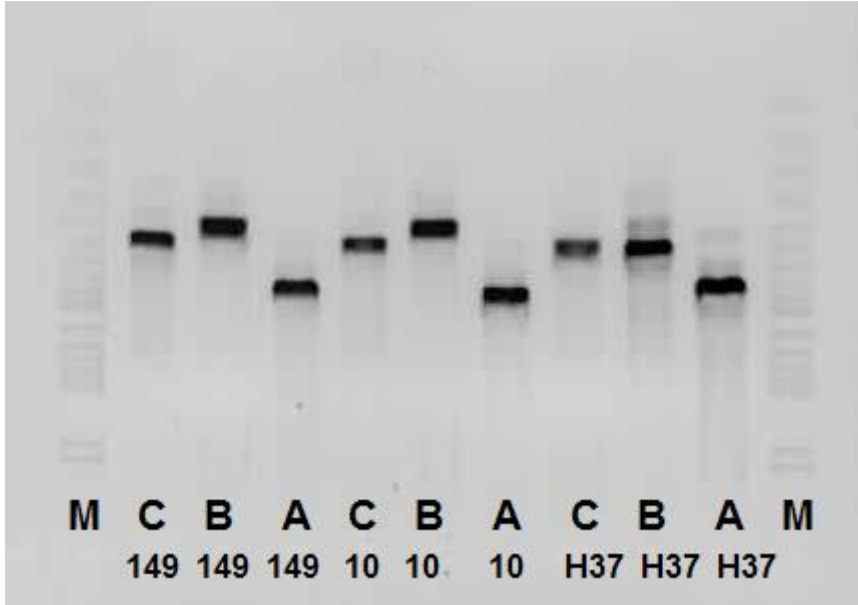
5.3. QBASIC 4.5 ile çalıştırılan yazılımın kodu

```
10 SCREEN 2: CLS : W = 0: OPEN "I", #1, "MIRU15.TXT": BEEP: OPEN "O", #2, "S.TXT": WRITE #2,
"KULLANILAN PRIMER SAYISI", "PRIMERLER", "GRUP SAYISI", "TANIMLANAMAYAN IZOLAT
SAYISI", "TEK IZOLAT"
20 WHILE NOT EOF(1)
30 INPUT #1, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15: W = W + 1
40 'PRINT P1;P2;P3;P4;P5;P6;P7;P8;P9;P10;P11;P12;P13;P14;P15
50 WEND: CLOSE #1: DIM P(W, 15): DIM EN$(15, 4): FOR X = 1 TO 15: EN$(X, 3) = STR$(W): NEXT X
55 A$ = INKEY$: IF A$ = "" THEN 55
100 WW = 0: OPEN "I", #1, "MIRU15.TXT"
120 WHILE NOT EOF(1)
130 INPUT #1, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15: WW = WW + 1
140 P(WW, 1) = P1
150 P(WW, 2) = P2
160 P(WW, 3) = P3
170 P(WW, 4) = P4
180 P(WW, 5) = P5
190 P(WW, 6) = P6
200 P(WW, 7) = P7
210 P(WW, 8) = P8
220 P(WW, 9) = P9
230 P(WW, 10) = P10
240 P(WW, 11) = P11
250 P(WW, 12) = P12
251 P(WW, 13) = P13
252 P(WW, 14) = P14
253 P(WW, 15) = P15
260 WEND: CLOSE #1
270 FOR X = 1 TO W
280 PRINT P(X, 1); P(X, 2); P(X, 3); P(X, 4); P(X, 5); P(X, 6); P(X, 7); P(X, 8); P(X, 9); P(X, 10); P(X, 11);
P(X, 12); P(X, 13); P(X, 14); P(X, 15)
290 NEXT X
300 DIM TANIM$(W, 1): PRINT TIMES
310 FOR P1 = 15 TO 1 STEP -1
320 FOR P2 = P1 TO 0 STEP -1: IF P2 = 0 THEN 330
321 IF P2 = P1 THEN 1210
330 FOR P3 = P2 TO 0 STEP -1: IF P3 = 0 THEN 340
331 IF P3 = P1 OR P3 = P2 THEN 1200
340 FOR P4 = P3 TO 0 STEP -1: IF P4 = 0 THEN 350
341 IF P4 = P1 OR P4 = P2 OR P4 = P3 THEN 1190
350 FOR P5 = P4 TO 0 STEP -1: IF P5 = 0 THEN 360
351 IF P5 = P1 OR P5 = P2 OR P5 = P3 OR P5 = P4 THEN 1180
360 FOR P6 = P5 TO 0 STEP -1: IF P6 = 0 THEN 370
361 IF P6 = P1 OR P6 = P2 OR P6 = P3 OR P6 = P4 THEN 1170
362 IF P6 = P5 THEN 1170
370 FOR P7 = P6 TO 0 STEP -1: IF P7 = 0 THEN 380
371 IF P7 = P1 OR P7 = P2 OR P7 = P3 OR P7 = P4 THEN 1160
372 IF P7 = P5 OR P7 = P6 THEN 1160
380 FOR P8 = P7 TO 0 STEP -1: IF P8 = 0 THEN 390
381 IF P8 = P1 OR P8 = P2 OR P8 = P3 OR P8 = P4 THEN 1150
382 IF P8 = P5 OR P8 = P6 OR P8 = P7 THEN 1150
390 FOR P9 = P8 TO 0 STEP -1: IF P9 = 0 THEN 400
391 IF P9 = P1 OR P9 = P2 OR P9 = P3 OR P9 = P4 THEN 1140
392 IF P9 = P5 OR P9 = P6 OR P9 = P7 OR P9 = P8 THEN 1140
400 FOR P10 = P9 TO 0 STEP
```

6. BULGULAR

6.1. *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının MIRU ve ETR gen bölgelerinin tekrar sayılarının belirlenmesi

Agar jel elektroforez görüntülerine göre elde edilen bantlar moleküler büyüklük göstergesi ile karşılaştırılıp değerlendirildi. Bu işlem her izolat ve her primer için ayrı ayrı yapıldı.



Resim 1. H37Rv(H37) suşu, 10 ve 149 nolu hasta izolatlarının ETR-A(A), ETR-B(B), ETR-C(C) gen bölgelerinin agar jel elektroforez görüntüleri.

Tablo 1’de belirtilen MIRU ve ETR gen bölgeleri için belirlenmiş olan tekrarların büyüklükleri sayesinde tekrar sayıları hesaplanarak bulundu.

Primer	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	A	B	C
Bölge	236	182	272	419	292	131	365	291	321	160	238	276	195	121	44
Tekrar	53	77	53	53	77	53	54	51	53	53	53	54	75	57	58
H37Rv	342	413	431	525	446	449	419	444	480	319	344	330	420	292	276

Tablo 1: Bölge: MIRU ve ETR gen bölgelerinin tekrarlar olmadan büyüklüğü
Tekrar: MIRU ve ETR gen bölgelerinde bir tekrarın büyüklüğü
H37Rv: H37Rv suşunun MIRU ve ETR gen bölgelerinin tekrarlarıyla birlikte büyüklüğü (71,72)

H37Rv suşu için MIRU ve ETR gen bölgelerindeki tekrar sayılarının hesaplanması;

MIRU 2 bölgesinin tekrar sayısı:	$236 + 53.x = 342$	tekrar sayısı (x) = 2
MIRU 4 bölgesinin tekrar sayısı:	$182 + 77.x = 413$	tekrar sayısı (x) = 3
MIRU 10 bölgesinin tekrar sayısı:	$272 + 53.x = 431$	tekrar sayısı (x) = 3
MIRU 16 bölgesinin tekrar sayısı:	$419 + 52.x = 525$	tekrar sayısı (x) = 2
MIRU 20 bölgesinin tekrar sayısı:	$292 + 77.x = 446$	tekrar sayısı (x) = 2
MIRU 23 bölgesinin tekrar sayısı:	$131 + 53.x = 449$	tekrar sayısı (x) = 6
MIRU 24 bölgesinin tekrar sayısı:	$365 + 54.x = 419$	tekrar sayısı (x) = 1
MIRU 26 bölgesinin tekrar sayısı:	$291 + 51.x = 444$	tekrar sayısı (x) = 3
MIRU 27 bölgesinin tekrar sayısı:	$321 + 53.x = 480$	tekrar sayısı (x) = 3
MIRU 31 bölgesinin tekrar sayısı:	$160 + 53.x = 319$	tekrar sayısı (x) = 3
MIRU 39 bölgesinin tekrar sayısı:	$238 + 53.x = 344$	tekrar sayısı (x) = 2
MIRU 40 bölgesinin tekrar sayısı:	$276 + 54.x = 330$	tekrar sayısı (x) = 1
ETR A bölgesinin tekrar sayısı:	$195 + 75.x = 420$	tekrar sayısı (x) = 3
ETR B bölgesinin tekrar sayısı:	$121 + 57.x = 292$	tekrar sayısı (x) = 3
ETR C bölgesinin tekrar sayısı:	$44 + 58.x = 276$	tekrar sayısı (x) = 4

152 *Mycobacterium tuberculosis* hasta izolatı ve H37Rv suşunun her bir MIRU bölgesi için bulunan tekrar sayıları tabloya işlendi. Saptanamayan bantlar yerine 9 yazıldı.

Tablo 2. 1 numarada gösterilen H37Rv suşunun ve 152 hasta izolatının MIRU ve ETR gen bölgelerinin tekrar sayıları

	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	A	B	C
1	2	3	3	2	2	6	1	3	3	3	2	1	3	3	4
2	1	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	4	2	2	4
3	1	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	4	3	2	4
4	1	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	5	3	2	4
5	1	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
6	1	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
7	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3	3	2	3
8	1	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3	3	2	3
9	1	2	3	3	2	3	1	5	3	3	2	2	5	2	4
10	2	2	3	2	2	5	2	6	4	3	2	5	3	2	4
11	2	2	3	1	1	5	1	4	3	3	2	4	3	2	4
12	2	2	5	3	2	4	1	5	3	3	2	3	3	2	3
13	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
14	2	2	3	2	2	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
15	2	2	6	2	2	5	1	1	3	3	2	2	5	2	4

	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	A	B	C
16	2	2	4	1	1	5	3	3	2	4	2	2	3	2	4
17	2	2	3	3	2	4	1	5	3	3	2	2	5	2	4
18	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
19	2	2	3	1	2	5	1	4	3	3	2	2	2	2	4
20	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
21	2	1	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2	2	2	4
22	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	2	3	2	3
23	2	2	2	3	2	5	1	5	3	3	2	1	3	2	4
24	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	2	3	2	3
25	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	1	2	2	3
26	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	3	3	2	4
27	2	2	4	9	2	3	1	5	3	2	2	1	5	2	4
28	1	2	3	3	2	5	1	5	4	3	2	3	2	2	4
29	9	2	9	4	2	3	1	5	3	3	2	1	9	2	4
30	9	2	9	3	6	9	1	1	2	4	2	9	9	9	9
31	2	2	5	1	2	3	1	5	3	3	2	1	3	2	3
32	2	2	3	2	2	5	1	5	3	3	2	2	3	2	4
33	2	2	5	3	2	3	1	3	3	3	2	1	3	2	3
34	2	2	5	1	2	5	1	5	3	3	2	1	3	2	3
35	2	2	3	1	2	5	1	3	3	3	2	4	2	2	4
36	2	2	9	1	2	9	1	3	3	2	9	4	9	9	3
37	2	2	5	3	2	5	1	3	3	3	2	4	3	2	4
38	1	2	4	1	2	6	1	3	3	2	2	4	2	2	3
39	2	2	3	1	2	5	1	3	2	3	2	2	3	2	4
40	2	2	3	3	2	6	1	3	3	2	2	4	2	2	3
41	2	2	5	3	2	5	1	3	3	3	2	4	3	2	3
42	2	1	4	1	2	5	1	3	3	3	2	4	3	2	4
44	2	2	9	1	2	5	1	3	9	2	2	4	4	2	1
45	2	1	5	1	2	5	1	3	3	3	2	4	3	2	4
46	2	2	3	1	2	5	1	3	3	3	2	4	3	2	4
47	2	2	3	1	2	5	1	3	3	3	2	2	3	2	4
48	2	2	3	1	2	5	1	3	3	3	2	2	3	2	4
49	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3	3	2	3
50	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
51	2	1	5	1	2	5	1	2	3	3	2	2	3	2	4
52	2	1	5	1	2	5	1	2	3	3	2	2	3	2	4

	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	A	B	C
53	2	2	4	3	2	3	1	5	3	3	2	3	3	2	3
54	2	2	3	4	2	5	1	4	3	3	2	2	2	2	4
55	2	2	2	1	2	5	1	5	3	3	2	4	3	2	4
56	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	4	3	2	4
57	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	5	3	2	4
58	3	3	3	2	2	6	1	6	3	3	2	1	2	2	4
59	2	2	3	1	2	5	1	5	2	3	2	4	2	2	4
60	2	3	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4	5	2	4
61	1	2	3	3	2	6	1	4	3	3	2	1	2	2	2
62	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	6	3	2	4
63	2	2	3	3	2	3	1	3	3	4	2	3	4	2	3
64	2	3	3	3	2	5	1	6	3	4	2	4	4	2	4
65	2	2	3	2	2	5	1	3	3	3	2	2	3	2	3
66	2	2	5	3	2	5	1	5	2	3	2	3	3	2	3
67	2	1	4	1	2	5	1	1	3	3	2	2	3	2	4
68	2	1	3	1	2	5	1	1	3	3	2	2	3	2	4
69	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4	5	2	4
70	2	2	2	1	2	5	1	5	2	3	2	4	3	2	4
71	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	1	3	2	4
72	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	4	2	2	4
73	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	3	3	2	4
74	2	2	5	3	1	5	1	4	3	3	2	2	3	2	3
75	2	2	5	3	1	5	1	5	3	3	2	2	3	2	3
76	2	1	5	1	2	5	1	1	3	3	2	1	3	2	4
77	2	1	5	1	2	5	1	1	3	3	2	1	3	2	4
78	2	1	5	1	2	5	1	1	3	3	2	1	3	2	4
79	2	1	5	1	2	5	1	1	3	3	2	1	3	2	4
80	2	2	4	3	2	3	1	5	3	3	2	1	4	2	3
81	1	2	4	3	2	3	1	5	3	3	2	1	4	2	3
82	1	2	3	1	2	5	1	6	3	3	2	2	3	2	4
83	1	3	3	3	2	6	1	5	3	3	2	1	3	2	3
84	2	2	4	1	2	5	1	4	3	3	2	4	3	2	2
85	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4	3	2	4
86	1	3	3	1	2	5	1	5	4	3	2	4	3	2	4
87	2	1	4	1	9	5	1	1	3	3	2	2	3	2	4
88	2	2	3	9	2	5	1	5	3	3	2	4	3	2	4

	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	A	B	C
89	9	2	9	3	2	9	1	9	4	2	9	9	9	9	9
90	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	2	2	2	3
91	2	1	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2	3	2	4
92	2	2	3	3	2	5	1	5	4	3	2	2	3	2	4
93	2	2	5	2	1	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
94	2	2	5	2	2	5	1	5	3	3	2	2	3	2	3
95	9	2	9	9	2	9	1	9	3	3	2	4	9	9	9
96	2	2	2	1	2	5	1	5	2	3	2	4	3	2	4
97	2	3	3	3	2	4	2	3	3	3	2	2	6	4	5
98	2	2	5	3	2	5	1	4	3	3	2	4	3	2	4
99	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
100	2	2	5	9	2	9	9	1	9	3	9	2	3	2	4
101	2	2	3	2	2	5	1	5	3	3	2	4	3	1	4
103	3	3	4	3	2	4	2	5	3	3	2	4	7	4	3
104	2	2	9	3	2	5	1	5	3	2	2	6	2	2	2
105	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	4	3	2	3
106	2	2	3	1	2	5	1	4	4	2	2	5	3	1	4
107	2	1	3	3	2	5	1	5	3	3	2	6	3	2	3
108	1	3	2	3	1	5	1	5	3	3	2	4	5	2	4
109	2	2	3	2	2	5	1	5	3	3	2	4	3	2	3
110	2	3	5	1	2	5	1	1	3	2	2	3	5	2	5
111	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
112	2	2	6	2	2	5	1	1	3	2	2	3	5	2	5
113	2	2	3	1	2	5	1	4	3	3	2	4	3	2	4
114	9	9	9	2	9	9	7	1	6	9	9	3	9	9	9
115	2	1	4	1	2	5	1	1	3	3	2	2	3	2	4
116	9	1	9	1	9	9	9	9	1	1	9	9	9	9	9
117	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	4	3	2	3
118	2	2	3	3	2	5	1	7	3	2	2	4	5	2	4
119	3	3	3	3	2	3	1	6	3	3	2	2	5	2	5
120	2	2	5	3	1	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3
121	2	2	3	1	2	5	1	5	3	4	2	3	3	2	4
122	2	2	3	3	2	5	1	4	3	3	2	2	2	2	4
123	2	2	5	2	2	5	1	5	3	4	2	3	3	2	3
124	2	2	3	2	1	5	1	5	3	3	2	2	3	2	4
125	2	2	2	4	2	5	1	5	3	3	2	2	2	2	4

	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	A	B	C
126	2	2	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2	3	2	4
127	2	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	3	1	2	4
128	2	2	3	1	2	5	1	3	3	3	2	2	3	2	4
129	3	3	3	3	2	3	1	5	3	4	2	4	3	2	4
130	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	3	1	2	4
131	2	2	2	1	2	5	1	5	3	3	2	3	3	2	4
132	2	2	3	1	2	5	3	5	3	3	2	4	3	2	4
133	2	2	3	1	2	5	3	5	3	3	2	4	3	2	4
134	2	2	3	1	2	5	3	5	3	3	2	4	3	2	4
135	2	2	3	1	2	5	3	5	3	3	2	4	3	2	4
136	2	2	3	1	2	5	3	5	3	3	2	4	3	2	4
137	2	2	4	1	2	5	1	1	3	2	2	2	3	2	4
138	2	2	4	1	2	5	1	1	3	2	2	2	3	2	4
139	2	2	4	1	7	5	1	1	3	2	2	2	3	2	4
140	2	2	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2	3	2	4
141	2	2	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2	3	2	4
142	2	2	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2	3	2	4
143	9	9	9	9	9	9	9	9	9	2	2	9	3	2	4
144	2	2	5	1	2	5	1	1	3	2	2	2	3	2	4
145	2	2	5	1	2	5	1	1	3	2	2	2	3	2	4
146	2	3	3	1	2	5	1	5	3	2	2	4	3	2	4
147	4	2	4	5	2	7	3	6	5	4	2	1	3	2	4
148	3	5	3	2	2	5	4	6	4	3	2	2	3	2	3
149	2	1	6	1	2	6	3	1	3	3	2	1	3	2	4
150	2	1	6	1	2	5	2	1	3	3	2	1	3	2	3
151	1	5	2	3	2	6	2	4	2	5	2	3	3	2	4
152	2	2	3	2	2	5	2	6	3	3	2	1	5	2	6
153	2	2	3	4	2	5	2	6	4	3	2	1	3	2	4

6.2 Kullanılan primerlerin ayrı ayrı ve birlikte ayırım güçlerinin belirlenmesi

152 hasta izolatı ve H37Rv suşu ile elde edilen sonuçlara göre 15 farklı primer setinin hem tek başlarına hem de diğer primerlerle birlikte kullanıldıkları tüm kombinasyonların ayırım gücü QBASIC 4,5 programlama dili ile kodladığımız bir yazılım (Ek 1) kullanılarak hesaplandı.

Primer setleri tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen grup sayıları, tanımlanamayan izolat sayısı ve tek izolattan ibaret grup sayıları Tablo 3'de gösterildi.

Tablo 3. Primer setleri tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen grup sayıları, tanımlanamayan izolat sayısı ve tek izolattan ibaret grup sayıları

PRİMERLER	KÜME SAYISI	TEK İZOLAT	TANIMLANAMAYAN İZOLAT SAYISI
26	7	1	4
ETR-A	7	2	7
27	6	3	3
40	6	0	4
ETR-C	6	2	5
31	5	2	1
24	5	2	3
16	5	1	5
23	5	1	8
10	5	0	10
4	4	0	2
20	4	2	4
ETR-B	4	1	6
2	4	1	7
39	1	0	5

Ayrım gücü en yüksek olan primer seti ve sırasıyla kullanıldıkça ayrım gücünü en fazla arttıran primer setleri ile elde edilen grup sayıları, tanımlanamayan izolat sayısı ve tek izolattan ibaret grup sayıları MIRU-VNTR 12 için Tablo 4’de, MIRU-VNTR 12 + ETR-VNTR 3 için Tablo 5’de gösterildi.

Tablo 4. 12 MIRU primeri için ayrım gücü en yüksek olan primer seti ve sırasıyla kullanıldıkça ayrım gücünü en fazla arttıran primer setleri ile elde edilen grup sayıları, tanımlanamayan izolat sayısı ve tek izolattan ibaret grup sayıları

MIRU-VNTR 12	KÜME SAYISI	TEK İZOLAT	TANIMLANAMAYAN İZOLAT SAYISI
26	7	1	4
26, 40	24	7	5
26, 40, 16	47	25	8
26, 40, 16, 10	67	39	13
26, 40, 16, 10, 23	80	56	13
26, 40, 16, 10, 23, 31	89	64	9
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27	98	74	6
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27, 20	103	82	7
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27, 20, 2	108	88	8
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27, 20, 2, 4	110	89	8
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27, 20, 2, 4, 24	111	89	8
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27, 20, 2, 4, 24, 39	111	89	8

Tablo 5. 12 MIRU ve 3 ETR primeri için ayırım gücü en yüksek olan primer seti ve sırasıyla kullanıldıkça ayırım gücünü en fazla arttıran primer setleri ile elde edilen grup sayıları, tanımlanamayan izolat sayısı ve tek izolattan ibaret grup sayıları

MIRU-VNTR 12 + ETR-VNTR 3	KÜME SAYISI	TEK İZOLAT	TANIMLANAMAYAN İZOLAT SAYISI
26	7	1	4
26,40	24	7	5
26,40,16	47	25	8
26,40,16,10	67	39	13
26,40,16,10,ETR-A	80	55	12
26,40,16,10,ETR-A,31	90	66	8
26,40,16,10,ETR-A,31,27	98	74	6
26,40,16,10,ETR-A,31,27,23	104	82	6
26,40,16,10,ETR-A,31,27,23,2	110	91	7
26,40,16,10,ETR-A,31,27,23,2,20	115	99	8
26,40,16,10,ETR-A,31,27,23,2,20,ETR-C	119	105	6
26,40,16,10,ETR-A,31,27,23,2,20,ETR-C,4	121	108	6
26,40,16,10,ETR-A,31,27,23,2,20,ETR-C,4,24	122	109	6
26,40,16,10,ETR-A,31,27,23,2,20,ETR-C,4,24,ETR-B	122	109	6
26,40,16,10,ETR-A,31,27,23,2,20,ETR-C,4,24,ETR-B,39	122	109	6

7. TARTIŞMA

Tanı, tedavi ve kontrol yöntemlerindeki gelişmelere rağmen, tüberküloz önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. *M. tuberculosis*'in hızlı ve doğru laboratuvar tanısı tüberkülozlu hastaların tedavisinde ve hastalığın kontrolünde çok önemlidir. *M. tuberculosis*'in laboratuvar tanısında yıllardan beri kullanılmakta olan mikroskopi ve kültür, düşük duyarlılık ve geç sonuç verme gibi sınırlamalara sahiptir. Son yıllarda tanıda yaşanan bu sorunların aşılabilmesi amacıyla, klinik örneklerdeki *M. tuberculosis* DNA'sını çoğaltmaya yönelik nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) geliştirilmiş ve TB'un rutin tanısında yer almaya başlamışlardır (40,41,73).

Tüberkülozla etkin bir mücadele için hızlı ve duyarlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi kadar, epidemiyolojik verilerin alınacağı çalışmalara da ihtiyaç vardır. Bu nedenle son yirmi yılda moleküler epidemiyoloji, araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (4,46). Bu araştırmacıların çalışmaları ile farklı coğrafik bölgelerden soyutlanan izolat ve hasta gruplarının özelliklerini içeren veritabanları oluşturulmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, tıp, moleküler biyoloji, epidemiyoloji ve biyoistatistik gibi birden fazla disiplini ilgilendirmektedir.

Moleküler epidemiyoloji; bir hastalığın yayılımı, patogenezi ve etyolojisini araştıran bilim olarak tanımlanmaktadır. Bu özelliğe dayanarak moleküler epidemiyolojik çalışmalar, hastalığın yayılımı ile oluşan risk faktörlerinin ortaya çıkarılması, salgınların araştırılması, yayılım gösteren suşların araştırılması, reaktivasyon veya reenfeksiyon olgularının saptanması, patojenlerin dünyadaki yayılımlarının saptanması, farklı suşlarda virulans ve direnç mekanizmalarının anlaşılması, enfeksiyon hastalıklarının yayılım dinamiklerinin ve yayılım yollarının ortaya konması, tedavi ve korunma stratejilerinin geliştirilmesinde kullanılmaktadır (5,9).

Ülkemiz bir tarafta Batı Avrupa gibi düşük tüberküloz insidansına sahip ülkelerle komşuyken, diğer taraftan da Eski Sovyetler Birliği ve Asya ülkeleri gibi yüksek insidansa sahip bir coğrafyada bulunmaktadır (20). Hızlı nüfus artışı ve kırsal alandan büyük şehirlere göçün devam ettiği ülkemizde tüberkülozla etkin bir mücadele için izole edilen tüm suşların moleküler epidemiyolojik bilgilerinin çıkarılması kaçınılmazdır.

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, DSÖ'nün önerilerine rağmen, TB insidansı hala çok yüksektir. HIV sorunu ile ÇİD de bu artışı tetiklemektir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar sorunların anlaşılmasında ve kontrol mekanizmalarının geliştirilmesinde yararlı olmaktadır. IS6110 RFLP referans yöntem olarak kabul edilmekle birlikte benzer paternlere

sahip veya düşük kopya sayılı izolatların ayırımında yeterli olmamaktadır (52). Bu nedenle, ek yöntemlerin kullanılması ile daha iyi sonuçlar alınmaktadır. Bu yöntemler arasında; spoligotiplendirme, pTBN12, MIRU-VNTR, ETR-VNTR, DRE-PZT, RAPD PZT bulunmaktadır (9,10,52,55,62).

Son yıllarda, yeni moleküler yöntemlerin tanımlanması, TB epidemiyolojisi ve filogenetik analizlerine önemli katkılarda bulunmuştur. 1997 yılında Supply ve ark tarafından geliştirilen MIRU-VNTR yöntemi sonraki yıllarda uygulaması daha pratik hale getirilmiştir.

2002 yılı içerisinde bildirilen bir çalışmada Güney Afrika'da 6 yıl içinde toplam 56 hastadan alınmış 123 izolat IS6110 ve MIRU-VNTR yöntemleri kullanılarak kümeler oluşturulmuştur. Altı yıllık süre içinde MIRU-VNTR yönteminin tekrarlanabilirliği oldukça yüksek bulunmuş, 56 hastanın 55 inde (%98,2) karşılaştırılan izolatlar yıllar içinde aynı genetik profili göstermiştir. IS6110 yöntemiyle ise 56 hastadan soyutlanan izolatlardan sadece 45'inde (%80,3) yıllar içinde aynı genetik profil gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar MIRU-VNTR yönteminin kolay uygulanabilir ve hızlı olmasının yanında tekrarlanabilirliği yönünden de IS6110 yöntemine göre daha iyi performans gösterdiği sonucunda birleşmişlerdir (11).

Üç moleküler yöntemin birlikte uygulandığı ve 2002 yılında bildirilen bir çalışmada 11 farklı coğrafik bölgeden alınmış 116 *M. tuberculosis* klinik izolat genetik profil yönünden değerlendirilmiştir. Ayırt edici gücün Hunter-Gaston indeksi (HGI) ile saptandığı bu çalışmada spoligotiplendirme, MIRU ve tamamlayıcı üç VNTR (ETR-A, ETR-B, ETR-C) değerleri sırasıyla 0.956, 0.988, 0.959 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak en iyi ayırım gücü MIRU yöntemiyle bulunmuştur. Yöntemlerin ikişerli değerlendirilmesinde ise en iyi ayırımın MIRU + ETR-A, ETR-B, ETR-C yöntemleriyle yapıldığı saptanmıştır (10).

Supply P. ve arkadaşlarının 2001 yılında yayınlanmış olan çalışmalarında; 38 ayrı ülkeden, DNA dizi analiziyle 90 farklı *M. tuberculosis* izolatı olduğu belirlenen suşlara MIRU-VNTR yöntemi uygulanmıştır. Sonuç olarak MIRU-VNTR yönteminin diğer moleküler tiplendirme yöntemlerinden daha fazla ayırım gücüne sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, geliştirilen web sitesiyle MIRU-VNTR genotiplerinin internet yoluyla analizinin mümkün olduğu vurgulanmış, bunun da *M. tuberculosis*'in epidemiyolojik çalışmalarına evrensellik katacağı ve bu patojenin evriminin daha iyi izleneceği belirtilmiştir (12).

Bu çalışmada, 152 hasta izolatu ve H37Rv suşu ile elde edilen agar jel elektroforez sonuçlarını 15 farklı primer setinin hem tek başlarına hem de diğer primerlerle birlikte kullandıkları tüm kombinasyonların ayırım gücü QBASIC 4,5 programlama dili ile kodlanılan bir yazılım kullanılarak hesaplandı. Bu program ile bütün primerler tek tek ve kombine halde sırasıyla değerlendirildi. Sıralama, öncelikle ortaya çıkan küme sayısına göre yapıldı. Ortaya çıkan küme sayısı ne kadar fazla ise o primer kombinasyonu önceliğe sahiptir. Küme sayısının ardından sıralamayı belirleyen tanımlanamayan izolat sayısının ne kadar az olduğudur. Bu programla en son olarak tek izolat sayısına önem verildi. Küme sayısının ve tanımlanamayan izolat sayısının eşit olduğu durumlarda tek izolat sayısı fazla olan kombinasyon daha iyi ayırım gücüne sahiptir. Literatürdeki diğer MIRU-VNTR çalışmalarından farklı olarak bu çalışmada kullanılan QBASIC 4,5 programlama dili ile kodlanılan bir yazılım kullanıldı. Sola ve arkadaşlarının (10) çalışmasında, bu çalışma ile aynı primerler kullanılmış, her birinin ayırım gücü ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu çalışmada ise hem primerlerin ayırım gücü tek tek hesaplandı, hem de tüm kombinasyonların ayırım güçleri belirlendi.

Elde edilen sonuçlara göre primer setleri tek başlarına değerlendirildiklerinde en yüksek ayırım gücü MIRU 26 ve ETR-A primerleriyle saptanırken, en düşük ayırım MIRU 39 primeriyle elde edildi.

12 MIRU gen bölgesi primerine 3 ETR gen bölgesi primeri eklendiğinde ortaya çıkan küme sayısının 111 den 122 ye çıktığını ve ETR gen bölgesi primerlerinin ayırma önemli katkı sağladığı görülmektedir.

12 MIRU gen bölgesi primerleriyle ek olarak 3 ETR gen bölgesi primerlerinin kullanımı yani 15 primerin toplu kullanımı karşılaştırıldığında; ilk dört sırada tercih edilen primerlerde (MIRU 26, MIRU 40, MIRU 16 ve MIRU 10) değişiklik olmadığı görülmektedir (Tablo 4-5). Fakat gerekli ayırımı sağlamak için kullanılması gereken 5. primer olan MIRU 23'ün yerini ETR-A gen bölgesinin aldığı görülmektedir. Sıralamada 5. olarak kullanılması öncelikli primer MIRU 23 veya ETR-A gen bölgesine ait olmasının küme sayısını değiştirmediği belirlendi. Yani her iki primerin de ayrı ayrı ilk 4 primere eklenmesiyle 80 küme oluştu. Fakat ETR-A primeri 5. öncelikli olarak kullanıldığında tanımlanamayan izolat sayısı 12, MIRU 23 primerinde ise bu sayı 13 olarak saptandı. Ayrıca, ETR-A primeri 6. öncelikli primerle birlikte 90 küme oluştururken, MIRU 23 ile ancak 89 küme elde edildi. Kısacası ETR-A primerinin ayırım gücünün MIRU 23 primerinden daha yüksek olduğu ve 5. öncelikli primer olduğu görülmektedir.

12 MIRU gen bölgesi primerlerine 3 ETR gen bölgesi primerlerinin eklenmesi 12 MIRU gen bölgesi primerlerinin kendi içinde de kullanım sıralarında değişikliğe yol açtı. MIRU 23 primeri, 12 primerli sıralamada 5. önceliğe sahipken, ETR primerlerinin eklenmesiyle MIRU 31 ve MIRU 27 primerlerinin MIRU 23 primerinden daha iyi ayırım gücü sağladığı görüldü. Aynı şekilde MIRU 2 ve MIRU 20 primerlerinin kullanım önceliklerinin kendi aralarında değiştiği belirlendi. 12 MIRU primeri kullanıldığında MIRU 20 primerinin ayırım gücü MIRU 2 primerinden daha yüksekken, 15 primer kullanıldığında kullanım önceliğinin MIRU 2 lehine değiştiği saptandı.

ETR-C primeri, MIRU 4, MIRU 24 ve MIRU 39 primerleriyle kıyaslandığında kullanım önceliği olduğu söylenebilir. Bu nedenle 15 primerli olan sıralamada ETR-C primeri 11. sırada kullanılmalıdır.

Onbeş bölgeye ait primerlerin hepsi kullanıldığında, MIRU 24 primerinin küme sayısını sadece bir artırdığını, ETR-B ve MIRU 39 primerlerinin ise küme sayısına etkisinin olmadığı saptandı. Bu sonuçlar ışığında bizim toplumumuzdan elde edilen suşlarda moleküler çalışmalarda MIRU 24, ETR-B ve MIRU 39 bölgelerine ait primerleri kullanmanın önemli katkısı olamayacağı söylenebilir.

Bu çalışmada; 12 MIRU gen bölgesi primerlerine ek olarak 3 ETR gen bölgesi primerlerinin kullanılmasının ayırım gücünü önemli derecede artırdığı görülmektedir. 12 MIRU-VNTR ile küme sayısı 111, tek izolat sayısı 89 iken, 12 MIRU-VNTR + 3 ETR-VNTR ile küme sayısı 122, tek izolat sayısı 109 olarak saptandı. Oelemann ve arkadaşlarının (13) 154 izolatla yaptıkları çalışmada ise 12 MIRU-VNTR ile küme sayısı 104, tek izolat sayısı 84, 12 MIRU-VNTR + 3 ETR-VNTR ile küme sayısı 116, tek izolat sayısı 103 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada bilgisayar programı ile elde edilen kombinasyonlarda en yüksek ayırımı sağlayan MIRU 26, MIRU 40, MIRU 16, MIRU 10, ETR-A ve MIRU 31 primerlerinden MIRU 16 dışındakilerin ayırım gücü Sola ve arkadaşlarının (10) çalışmasında da çok yüksek düzeyde bulundu. Daha sonraki sıralamalarda ise ayırım güçlerinde farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu farklılıklar, toplumlar arasındaki farklardan kaynaklanabileceği gibi bu çalışmada kullanılan bilgisayar programına da bağlı olabilir. Sola ve arkadaşlarının çalışmasında primerlerin ayırım gücü tek tek değerlendirirken, bu çalışmada birbirlerine benzer şekilde ayırma neden olan primerlerin, elde edilen kombinasyonlardaki öncelik sırasını değiştirdiği düşünülebilir.

Bir tiplendirme yönteminin ayrımı güçlü bir şekilde yapmasının yanında hızlı sonuç vermesi ve ekonomik olması da önemlidir. *M. tuberculosis*'in moleküler olarak tiplendirilmesinin gerektiği durumlarda ve epidemiyolojik çalışmalarda MIRU-VNTR ve ETR-VNTR gen bölgeleri primerlerini kademeli bir şekilde kullanarak yöntemin daha hızlı sonuç vermesi ve ekonomik olması sağlanabilir. Primer setleri birlikte kullanıldıklarında ayırım güçlerine göre gruplara ayrılabilir. Ayırım gücü en yüksek olan 3'lü gruplarla hasta izolatları çalışmaya alınabilir. Bu çalışmadaki veriler ışığında, öncelikli olarak MIRU 26, MIRU 40 ve MIRU 16 primerleri, yeterli ayırım sağlanmadığında 2. sırada MIRU 10, ETR-A ve MIRU 31 primerleri, yine yeterli ayırım sağlanmadığında 3. olarak MIRU 27, MIRU 23 ve MIRU 2 primerleri ve yine yeterli ayırım sağlanmadığında ise son olarak MIRU 20, ETR-C ve MIRU 4 primerleri kademeli olarak kullanılabilir. Daha önce de belirttiği gibi çalışmada kullanılan suşlarda MIRU 24, ETR-B ve MIRU 39 primerleri yarar sağlamadığı için tercih edilmeyebilir. Primer setlerinin kademeli bir biçimde kullanılmasının zaman ve ekonomik yönden faydalar sağlayacağı aşikardır.

İkinci kez yinelenmesine rağmen bazı hasta izolatlarında bazı primerlere karşılık gelen agar jel elektroforez görüntülerinde herhangi bir bant saptanamadı. Bunun nedeni olarak bu izolatlarda DNA miktarının az miktarda olduğu düşünülebilir. Bu çalışmada genomik DNA izolasyonunda kullanılan kaynatma yöntemine bağlı olarak yeterli miktarda DNA izole edilememiş olabilir. Bu sorunu gidermek amacıyla başka bir izolasyon yöntemi denenmelidir. Çıkmayan bu bantların tekrar sayısı, programa uygun olması ve diğer tekrar sayılarıyla karışmaması için 9 tekrar olarak kabul edildi.

Sonuç olarak, moleküler yöntemler geliştirilmeden önce, TB epidemiyolojisinde çözümlenmemiş birçok sorun bulunmaktaydı. Aktif yayılımın ortaya çıkarılmasında moleküler tiplendirme kullanılmaya başlanmış ve geleneksel yöntemler ile ayırt edilemeyen izolatlar tanımlanabilmiştir. Bu çalışmalar, epidemiyolojik verilerle birleştirildiğinde ilişkili olgular ortaya çıkarılabilmektedir.

Nüfusunun büyük çoğunluğu şehirlerde yaşayan geniş bir coğrafyaya sahip ülkemizde tüberküloz ciddi bir tehdit unsuru olmaya devam etmektedir. Birçok kurumun ortak çalışmasıyla standart yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Arzu edilen, ülkemizdeki tüberküloz hastalarının tüm klasik epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve buna dayalı olarak yapılacak moleküler tiplendirme yöntemlerinin sonuçlarından da yararlanılarak daha etkin korunma ve kontrol önlemlerinin geliştirilmesidir. Ayrıca ülkemizde TB'un yayılımı, TB hastaları arasındaki epidemiyolojik ilişkilerin ortaya çıkarılması ve farklı coğrafik

bölgelerdeki hastalardan soyutlanan TB izolatlarının genotipik özelliklerinin belirlenmesi için çok merkezli çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. *M. tuberculosis* suşlarının moleküler tiplendirmesi, tüberkülozun yayılımının araştırılması, salgınların saptanması, laboratuvar çapraz kontaminasyonlarının ortaya çıkarılması, reaktivasyon-reenfeksiyonların belirlenmesi, hastalığın patogenezi ve etkenin virulans özelliklerinin ortaya çıkarılmasında önemli rol oynamaktadır
2. *M. tuberculosis* suşlarının moleküler tiplendirilmesinde MIRU-VNTR yöntemi ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilir ve uygulaması kolay, çok merkezli çalışmalara uygun ve otomatize edilebilir bir yöntemdir. MIRU-VNTR yöntemi uluslararası bir kodlama sisteminin olmasıyla, dünyada tüberküloz suşlarının yayılımının değerlendirilmesi açısından küresel epidemiyolojik sürveyans çalışmaları için de kullanılabilir özelliktedir.
3. QBASIC 4,5 programlama dili ile kodlanılan bir yazılım kullanılarak bütün primerler ayırım güçlerine göre tek tek ve kombine halde sırasıyla değerlendirilebilir.
4. 12 MIRU gen bölgesi primerine 3 ETR gen bölgesi primeri eklendiğinde ortaya çıkan küme sayısının artmasıyla ayırım gücünün arttığı görülmüştür.
5. En yüksek ayırım gücü MIRU 26 ve ETR-A primerleriyle saptanırken. en düşük ayırım MIRU 39 primeriyle elde edildi.
6. 12 MIRU gen bölgesi primerleriyle ek olarak 3 ETR gen bölgesi primerlerinin kullanımı yani 15 primerin toplu kullanımı karşılaştırıldığında; ilk dört sırada tercih edilen primerlerde (MIRU 26, MIRU 40, MIRU 16 ve MIRU 10) değişiklik olmadığı görülmektedir. Fakat gerekli ayırımı sağlamak için kullanılması gereken 5. primer olan MIRU 23'ün yerini ETR-A gen bölgesi primerinin aldığı saptanmıştır.
7. MIRU-VNTR ve ETR-VNTR gen bölgeleri primerlerini kademeli bir şekilde kullanarak yöntemin daha hızlı sonuç vermesi ve ekonomik olması sağlanabilir.
8. Öncelikli olarak MIRU 26, MIRU 40 ve MIRU 16 primerleri, yeterli ayırım sağlanmadığında 2. sırada MIRU 10, ETR-A ve MIRU 31 primerleri, yine yeterli ayırım sağlanmadığında 3. olarak MIRU 27, MIRU 23 ve MIRU 2 primerleri ve yine yeterli ayırım sağlanmadığında ise son olarak MIRU 20, ETR-C ve MIRU 4 primerleri kademeli olarak kullanılabilir.
9. Ülkemizde TB'un yayılımı, TB hastaları arasındaki epidemiyolojik ilişkilerin ortaya çıkarılması ve farklı coğrafik bölgelerdeki hastalardan soyutlanan TB izolatlarının

genotipik özelliklerinin belirlenmesi için MIRU-VNTR ve ETR-VNTR profilleri çok merkezli çalışmalarla ortaya çıkarılmalıdır. Böylece daha etkin korunma ve kontrol önlemlerinin geliştirilmesi sağlanacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Stop TB, Communicable Diseases. An Expanded DOTS Framework for Effective Tuberculosis Control. World Health Organization. Geneva,2002. WHO/CDC/TB/2002.297.
2. Task Force of ERS, WHO and the Europe Region of IUATLD. Tuberculosis management in Europe. Eur Respir J 1999; 14:978-92.
3. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı. Türkiye’de Verem Savaşı, 2007 Raporu. Ankara, 2007.
4. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35: 907-14.
5. Durmaz R. Tüberkülozun Moleküler Epidemiyolojisinde Yeni Gelişmeler. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu 9-12 Aralık, İzmir, 2004, Sayfa: 41-6.
6. Durmaz, R., Gunal, S., Yang, Z., Ozerol, IH., Cave, M.D. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 873-7.
7. Van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, van Embden JD. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol 1992; 30:1772-7.
8. Hermans PWM, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PEW, Dale JW, van Embden JDA. The insertion element IS 987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Infect Immun 1991; 59: 2695-705.
9. Durmaz R. Tüberkülozun Epidemiyolojik Araştırmalarında Laboratuvarın Yeri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, 2003, Sayfa: 443-56.
10. Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, Rastogi N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect Genet Evol 2003; 3: 125-33.
11. Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Locht C, Supply P. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002; 40: 4561-6.
12. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol 2001, 39: 3563-71.
13. Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Haas W, Rüsçh-Gerdes S, Locht C, Niemann S, Supply P. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive- unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. J Clin Microbiol. 2007; 45: 691-7.

14. Daniel TM. Captain of the Death. The Story of Tuberculosis. University of Rochester Pres, Rochester, 1997.
15. Barış İ.Y. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, 2003.
16. Sotomayor H, Burgos J, Arango M. Demonstration of tuberculosis by DNA ribotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in a Colombian prehispanic mummy. Biomedica 2004; 24: 18-26.
17. Palomino JC., Leão SC., Ritacco V. Tuberculosis 2007. (www.TuberculosisTextbook.com)
18. Karlıkaya C. Tüberküloz Ders Notları. 1998; <http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>
19. Bilgiç H. Tüberküloz Epidemiyolojisi ve Tüberküloz Tedavisi. Bilgiç, H(Ed.) Tüberküloz El Kitabı. GATA Basımevi-2003.
20. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiyede Tüberküloz Epidemiyolojisi ve Kontrolü. Uzun Ö, Ünal S (eds). Güncel bilgiler ışığında enfeksiyon hastalıkları, cilt 2, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002: 821-33.
21. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı. Türkiye’de Verem Savaşı, 2007 Raporu. Ankara, 2007.
22. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 3684-9.
23. Mc Nabb SJN, Braden CK, Navin TR. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: lessons learned and implications for the future. Emerg Infect Dis 2002; 8(11). (<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no11/02-402.htm>).
24. Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX, Wynne BA. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteriemia in human immunodeficiency virus-positive patients. J Infect Dis 1992; 165: 1082-5.
25. Cocito C, Glot P, Coene M. Paratuberculosis Clin Microbiol Rev 1994; 7: 328-45.
26. Boddingtonhaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, Bottger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 1990; 28: 1751-9.
27. Köksal F, Yaman A. Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, 2003, Sayfa:34-47.
28. Brennan P. J Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis, 2003; 83:91-7.
29. Özerol İH. 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, 2003, Sayfa: 1-6.
30. Pfyffer GE, Brown BA, Swenson JM, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation and Staining Procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds:) Manual of Clinical Microbiology 8th edition, ASM Pres, Washington DC, 2003.

31. Belisle JT. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 1997; 276:1420–2.
32. Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* 1992; 56:648–61.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Proposed Guideline*. CSLI document M48-P, Pennsylvania, USA, 2007.
34. World Health Organization (WHO), Laboratory Services in Tuberculosis Control. (WHO/TB/98.258), Geneva Switzerland.1998.
35. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard, NCCLS document M24-A (ISBN 1-56238-500-3). Pennsylvania USA 2003.
36. Uzun M: Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu (11-12 Haziran 2003) kitabında, Samsun: Otak Form-Ofset Basım San Tic. A.Ş., 1. Basım, Haziran 2003: 285-90.
37. Özakın C: Tüberküloz kültüründe kullanılan yeni yöntemler. Eds: M Uzun, Z Erturan. 4. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu (31 Ekim-2 Kasım 2002, Abant) kitabında, İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No: 45, 2002:49-56.
38. Bergman JS, Woods GL. Evaluation of ESP Culture System II for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to four primary anti-tuberculosis drugs. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2940-3.
39. Rüsç-Gerdes S, Domeli C, Nardi G. Multicenter evaluation of the MGIT for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. *J Clin Microbiol* 1999, 37: 45-8.
40. Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis Complex* in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5355-65.
41. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *The Lancet Infect Dis* 2003; 3:141-7.
42. Huggett JF, McHugh TD, Zumla A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *Int Biochem Cell Biology* 2003; 35:1407-12.
43. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC. Assessment by Meta-Analysis of PCR for Diagnosis of Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3233–40.
44. Noordhoek GT, Kol AH, Bjune G, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 277-84.
45. Flores LL, Pai M, Colford Jr JM, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiology* 2005; 5: 55.
46. Durmaz R. Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı 2001, Sayfa: 139-47.

47. Şengül Derbentli: Hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde moleküler biyolojik yöntemlerin yeri. In: Ağaçfidan A, Badur S, Türkoğlu S (eds): İnfeksiyon Hastalıklarının laboratuvar tanısında moleküler yöntemler, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayın No: 42, İstanbul,2002:6-13.
48. Hosoglu S. Moleküler Epidemiyolojide Temel Yöntemler. 3.Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Ankara, 2004, Sayfa:60-2.
49. Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*: J Clin Microbiol 1988; 26:2240-5.
50. Burgos MV, Pym AS. Molecular epidemiology tuberculosis. Eur Respir J 2002, 20: suppl. 36: 54s-65s.
51. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD. IS6110, and IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:188.
52. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 1999; 37: 2607-18.
53. Goyal M, Saunders NA, van Embden JDA, Young DB, Shaw RJ. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS 6110 Restriction Fragment Length Polymorphism. J Clin Microbiol; 1997; 35:647-51.
54. Mokrousov I., Narvskaya O. Methods for DNA Fingerprinting and Genotypic Detection of Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Protocols. S. Angeloff Institute of Microbiology, *Bulgarian Academy of Sciences* 2004;:25-30.
55. Durmaz, B., Durmaz, R. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 2001.Sayfa: 161-8.
56. Safi H, Aznar J, Palomares JC. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3 year period (1993-1995) in Seville, Spain. J Clin Microbiol 1997; 35:2472-6.
57. Heyderman RS, Goyal M, Roberts P, Ushewokunze S, Zizhou S, Marshall BG, Makombe R, Van Embden JD, Mason PR, Shaw RJ. Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by spoligotyping. Thorax 1998; 53:346-50.
58. Van der Zanden AG, Hoentjen AH, Heilmann FG, Weltevreden EF, Schouls LM, van Embden JD. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. Mol Pathol 1998; 51:209-14.
59. Wilson SM, Goss S, Drobniewski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a *Mycobacterium* reference unit. J Clin Microbiol 1998; 36:3385-8.
60. Cousins D, Williams S, Liebana E, Aranaz A, Bunschoten A, Van Embden J, Ellis T. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol 1998; 36:168-78.
61. Kremer K, Bunschoten A, Schouls L, Soolingen van D, Embden van J. "Spoligotyping" A PCR-Based Method to Simultaneously Detect and Type *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands version. 2002.

62. Singh HB, Chauhan DS, Singh D, Das R, Srivastava K, Yadav VS, Kumar, A, Katoch, VM, Sharma VD. Rapid Discrimination of Indian Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis-A preliminary Report. *Indian J Med Microbiol* 2002; 20:69-71.
63. Niemann S, Richter E, Rüsç GS. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamid-susceptible subtypes of *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:152-7.
64. Van Soolingen D, van der Zanden AG, de Haas PE, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraïne NA, Portaels F, Kolk AH, Kremer K, van Embden JD. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1840-5.
65. Pfyffer GE, Auckenthaler R, van Embden JDA, van Soolingen D. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *Mycobacterium tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect. Dis* 1998; 4:631-4.
66. Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, Van Embden JD, Cousins D. A tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2734-40.
67. Costello E, O'grady D, Flynn O, O'Brien R, Rogers M, Quigley F, Egan J, Griffin J. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3217-22.
68. Waecker –NJJ, Stefanova R, Cave MD, Davis CE, Dankner WM. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin to children receiving cancer therapy and to their health care providers. *Clin Infect Dis* 2000; 30:356-62.
69. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert MG, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. Highresolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:1901-6.
70. <http://www.ibl.fr/mirus/mirus.html>
71. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998; 144:1189–96.
72. Kwara A, Schiro R, Cowan LS, Hyslop NE, Wisner MF, Harrison SR, Kissinger P, Diem L, Crawford JT. Evaluation of the Epidemiologic Utility of Secondary Typing Methods for Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 2683–5.
73. Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120:418-28.