

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

**ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ(ÇİD) *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS İZOLATLARININ FİLOGENETİK
İLİŞKİLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN IS6110,MIRU-
VNTR(MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE
UNIT VARIABLE
NUMBER OF TANDEM REPEAT),SPOLIGOTYPING
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Gülfer YAKICI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA 2013

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

**ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ(ÇİD) MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS İZOLATLARININ FİLOGENETİK
İLİŞKİLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN IS6110,MIRU-
VNTR(MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE
UNIT VARIABLE
NUMBER OF TANDEM REPEAT),SPOLIGOTYPING
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Gülfer YAKICI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

**Bu çalışma TF2011 D1 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA 2013

KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan
“ Çoklu ilaç dirençli (ÇİD) Mycobacterium tuberculosis izolatlarının filogenetik ilişkilendirilmesinde
kullanılan IS6110, Miruvntr (Mycobacterial interspersed repetitive unit variable number of tandem repeat)
spoligotyping yöntemlerinin karşılaştırılması”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 29 / 07 / 2013

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Fügen YARKIN
Çukurova Üniversitesi
Raportör


Prof. Dr. Rıza Dinçer YILDIZTAŞ
Çukurova Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Şeref ERDOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalanma imkânı bulduğum, beni her konuda sabırla destekleyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli bölüm hocalarım Sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN, Sayın Prof. Dr. Akgün YAMAN ve Sayın Prof. Dr. Macit İLKİT'e, yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan kıvanç duyduğum Arş. Gör. Dr. Taylan BOZOK, Uzm. Dr. Begüm KAYAR ve Emel YARAR olmak üzere tüm tüberküloz çalışma grubu ve Ç.Ü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma, eğitimim boyunca hiçbir yardımı esirgemeyen bölüm sekreterimiz Sn. Suna GÖKMEN'e ve son olarak hayatımın her anında yanımda olup beni destekleyen sevgili babam Ali YAKICI, annem Hatice Nazlı YAKICI ve manevi ablam Meryem İNCESoy'a benimle attıkları her adım için teşekkür ederim.

Gülfer YAKICI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	V
TABLO LİSTESİ	VI
KISALTMA LİSTESİ	VII
ÖZET-ANAHTAR SÖZCÜKLER	IX
ABSTRACT-KEYWORDS	X
1-GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Mikobakterilerin Özellikleri	6
2.2.1 Mikobakterilerin Hücre Yapısı	7
2.3. Mikobakterilerin Sınıflandırılması	8
2.3.1. <i>M. tuberculosis</i> Kompleks (MTK)	12
2.3.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
2.3.1.2. <i>M. bovis</i> ve <i>M. bovis</i> BCG	13
2.3.1.3. <i>M. africanum</i>	13
2.3.1.4. <i>M. microti</i>	14
2.3.1.5. <i>M. canettii</i>	14
2.3.1.6. <i>M. pinnipedii</i>	15
2.3.1.7. <i>M. caprae</i>	15
2.4. Antijenik Yapı ve Virulans Faktörleri	15
2.4.1. Mikobakteriyel Proteinler	16
2.4.1.1. Old Tüberkülin (OT)	16
2.4.1.2. Saflaştırılmış Protein Türevi (PPD)	16
2.4.1.3. Isı Şok Proteinleri - HspX (65Kda, 38 da,Kda)	16
2.4.1.4. 65 kDa Protein	16
2.4.1.5. 19 kDa Lipoprotein	16
2.4.1.6. ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein)	17
2.4.2. Mikobakteriyel Lipidler	17
2.4.2.1. Lipoarabinomannan	17
2.4.2.2. WaxD	17
2.4.2.3. Trehaloz-6,6 Dimikolat(Kord Faktör)	17
2.4.2.4. Sülfolipidler (Sülfatidler)	17
2.4.2.5. Fosfatidil İnoзит Mannozyd (PIM)	18
2.4.3. Mikobakteriyel Enzimler	18
2.4.4. Transkrip Regülatörleri	18
2.5. Patogenez, Patoloji ve Klinik Tablo	19
2.5.1. Klinik Tablolar	19
2.5.1.1. Primer Tüberküloz	19
2.5.1.2. Miliyer Tüberküloz	20
2.5.1.3. Sekonder Tüberküloz	20
2.5.1.3.1. Endojen Reaktivasyon	20
2.5.1.3.2. Ekzojen Reinfeksiyon	20
2.5.1.4. Ekstrapulmoner Tüberküloz	20
2.6. Konak Savunma Mekanizmaları ve İmmun Cevap	21
2.6.1. Doğal İmmun Cevap	21

2.6.1.1. Makrofajlar	21
2.6.1.2. Nötrofiller	22
2.6.2.Kazanılmış İmmun Cevap	22
2.6.2.1. Humoral İmmun Cevap	22
2.6.2.2.Hücrel İmmun Cevap	22
2.6.2.2.1. Sitokinler	22
2.6.2.2.2.CD4+ Hücreleri	23
2.6.2.2.3.CD8+ T Hücreleri	23
2.7. Laboratuvar Tanı	23
2.7.1. Mikroskopi	24
2.7.2. Kültür	24
2.7.3. <i>M.tuberculosis</i> Kompleksinin İdentifikasyonu	26
2.7.3.1. Biyokimyasal yöntemler	26
2.7.3.2.BACTEC NAP Testi	26
2.7.3.3.Moleküler Yöntemler	26
2.7.3.3.1. IS6110-PCR-RFLP	27
2.7.3.3.2. Spoligotyping	27
2.7.3.3.3. MIRU-VNTR	28
2.7.4. Antimikrobiyel İlaçlar	28
2.7.4.1. İlaç Direnci	28
2.7.4.1.1.Streptomisin	30
2.7.4.1.2. İsoniazid	30
2.7.4.1.3. Rifampisin	31
2.7.4.1.4. Etambutol	31
2.7.4.1.5. Pirazinamid	31
2.8. Tüberküloz Tedavisi	32
2.8.1. Birinci Seçenek İlaçlar	32
2.8.2. İkinci Seçenek İlaçlar	32
2.9.Epidemiyoloji	32
3.GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. <i>M. tuberculosis</i> Suşları	35
3.2.Duyarlılık Testleri	35
3.2.1.MGİT 960 Sistemi ile antibiyotik duyarlılığının Belirlenmesi	35
3.2.1.1. Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması	35
3.2.1.2. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz MGIT Tüplerinin Hazırlanması	35
3.2.1.3. İnokulum Hazırlanması	36
3.2.1.4. İnokülasyon	36
3.2.1.5. Sonuçların Yorumlanması	36
3.3. DNA Ekstraksiyonu	37
3.3.1. Sıvı Besiyerinden DNA Ekstraksiyonu	37
3.3.2. Koloniden DNA Ekstraksiyonu	38
3.4.IS6110-RFLP	38
3.4.1. Prop Hazırlanması ve İşaretlenmesi	38
3.4.2. IS6110-RFLP Prosedürü	40
3.4.3. IS6110-RFLP Metodunda Kullanılacak Çözeltiler	43
3.5. Spoligotyping	47
3.5.1. PCR	47
3.5.2. Spoligotyping Metodunda Kullanılacak Çözeltiler	48

3.5.3. PCR Ürününün Hibridizasyonu ve Görünür Hale Getirilmesi	49
3.5.4. Membranın Görüntülenmesi ve Yorumlanması	50
3.5.5. Membranın Regenerasyonu	51
3.6.MIRU-VNTR	51
3.6.1.PCR	51
3.6.2.PCR Ürününün Agaroze Jele Yüklmesi ve Elektroföze	
Yorumlanması	52
4.BULGULAR	53
5.TARTIŞMA	57
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	61
7.KAYNAKLAR	62
8.ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil1. Mikobakteriyel hücre duvarı yapısı	8
Şekil2. <i>M. tuberculosis</i> kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki	12
Şekil3.2011 yılı için tahmin edilen TB insidansı	34
Şekil4. MGIT tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları	36
Şekil5.Spoligotyping ile elde edilen genotip profilleri	54
Şekil6.MIRU-VNTR jel görüntüsü	56

TABLO LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Runyon Sınıflandırması	10
Tablo 2. Woods ve Washington sınıflandırması	11
Tablo3.Tüberküloza karşı konak cevabında makrofajların rolü	21
Tablo4.Fagositoza karşı mikobakterilerin savunması	22
Tablo5. <i>M.tuberculosis</i> 'de ilaçlara direnç oluşturan genler ve mutasyon sıklığı	29
Tablo6. <i>M.tuberculosis</i> 'in direnç ölçümünde kullanılan MGIT'ların son ilaç konsantrasyonları	30
Tablo7. DIG random primed DNA işaretleme kiti	45
Tablo8. Değerlendirmeye alınan balgam örneklerinin merkezlere dağılımı	53
Tablo9. M tuberculosis ilaç direnci MDR tespit edilen hastaların illere dağılımı	53
Tablo10. M.Tuberculosis izolatlarının spoligotyping ile genotiplere dağılımı	55

KISALTMALAR

AIDS :Acquired Immune Deficiency Syndrome-:Kazanılmış Bağışıklık Yetmezlik Sendromu

ARB: Asido Resistant Bacil

BAL : Bronko alveolar lavaj sıvısı

BCG: Bacillus Calmette Guerin

BP:Baz Çifti

BOS:Beyin Omurilik Sıvısı

CFP :Culture Filtrate Protein

CR: Kompleman Reseptörü

CRISP:Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-düzenli kümelenmiş spacer arası kısa palindromik tekrarlar

DNA: Deoksiribonükleik asit

DR: Direct Repeat

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EMB: Etambutol

ESAT :Early Secretory Antigenic Target

ETR: Exact Tandem Repeat

EZN: Erlich Ziehl Nelsen

GI :Üreme İndeksi

HCL:Hidroklorik Asit

HIV :Human Immunodeficiency Virus-İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü

Hsp:Heat Shock Protein-Isı Şok Proteini

INH: İzoniazid

INF :İnterferon

IS :Insertion Sequence

kDa : Kilo Dalton

LAM: Lipoarabinomannan

MDR-TB :Multi Drug-Resistant Tuberculosis-Çok İlaça Dirençli Tüberküloz

MGIT 960 :Mycobacterium Growth Indicator Tube

MHC : Major Histocompatibility Complex

MIRU: Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit

MIK :Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MOTT: Mycobacterium Other Than Tuberculosis
MTK: *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi
NaCl : Sodyum Klorür
NALC :N-asetil L-sistein
NaOH :Sodyum hidroksit
NAP :N-asetil beta hidroksi propiyofenon
OT : Old Tüberkülin
PAS : Para-amino Salisilik Asit
PCR: Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIM :Fosfatidil inozitol mannozit
PPD: Purified Protein Derivative
PZA: Pirazinamid
RD: Region of Difference
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF: Rifampisin
rRNA :Ribozomal Ribonükleik asit
RRDR :Rifampin Resistance Determining Region
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SSC:Saline Sodium Citrat Buffer
SSPE:Saline Sodium Phosphate EDTA
STR :Streptomisin
TB :Tüberküloz
TCH :Tiyofen-2-Karboksilik Asit Hidrazid
TNF :Tümör Nekrozis Faktör
VNTR: Variable Number of Tandem Repeat
XDR-TB :Extensively Drug-Resistant Tuberculosis-Artmış İlaç Dirençli Tüberküloz

ÖZET

Tüberkülozun az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki yüksek insidansı ve en az 2 major ilaca (MDR) ek olarak iki minor ilaca dirençli (XDR) suşlarının ortaya çıkışları, busuşlarla birlikte özellikle anti-tüberküloz tedaviye cevap vermeyen Beijing suşlarının tüm dünyada yayılma eğilimi göstermesi tüberküloz kontrol programlarının en önemli handikapıdır. Bu global problem *M tuberculosis* suşlarının toplum içerisindeki hareketlerinin daha duyarlı ve yüksek ayırım gücüne sahip moleküler epidemiyolojik yöntemlerle izlenmesi ile aşılabılır. Bu amaçla Hsp65, IS6110, ve genomdaki random dağılım gösteren kısa tekrarların polimorfizmini hedef alan PCR, PCR-RFLP, MIRU-VNTR ve spoligotipleme gibi moleküler yöntemler ve modifikasyonları denenmiştir. Yapılan çalışmalarda bu yöntemlerin tek başlarına ayırım güçlerinin iki veya daha fazla yöntemin birlikte kullanılması ile elde edilecek ayırım gücünden daha düşük olduğu gösterilerek birden çok yöntemin kullanıldığı çalışmalar önerilmiştir. Daha önceki çalışmalarımızda bölgemizde akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilen *M tuberculosis* suşlarının epidemiyolojik özelliklerinin tespiti için bu yöntemlerden bazıları laboratuvarımızda denenmiş, Beijing suşunun bölgemizdeki varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada epidemiyolojik amaçlarla kullanılan IS6110 PCR-RFLP, 15 lokus MIRU-VNTR ve spoligotyping yöntemi ile *M tuberculosis* suşları arasındaki ilişkinin sorgulanması ve 3 yöntemin birlikteliği ile elde edilecek yüksek ayırım gücünün epidemiyolojik çalışmalara sağladığı muhtemel katkı tartışılacaktır. Bu proje kapsamında Ç.Ü THAUM ve Bölge Tüberküloz laboratuvarına gönderilen balgam örneklerinden sıvı [BACTEC 960 TB (hızlı)] ve katı [Löwenstein Jensen Besiyeri (yavaş)] kültür ortamlarında üretilen ve ticari kart testler ile *M.tuberculosis* kompleksi üyesi oldukları tespit edilen *M.tuberculosis* izolatları IS6110, MIRU-VNTR ve Spoligotyping yöntemleri ile tür düzeyinde tayin edilecek ve filogenetik ilişkileri irdelenecektir.

Anahatar kelimeler: IS6110, MIRU-VNTR , *Mycobacterium tuberculosis*, Spoligotyping

ABSTRACT

High incidence of tuberculosis in developed and developing countries and apperaring of strains with resistance to two majo rdrugs (MDR) in addition to two minor drugs (XDR) and tendency to spread of beijing strains which does not give response to anti-tuberculosis treatment in th whole world ar ethe mostimport ant handicaps of tuberculosis control programmes. This global problem can be exceed by monitoring M. Tuberculosis strains with more sensitive and more discriminative molecular epidemiologic methods. In this manner molecular methods and modifications like PCR, PCR-RFLP, MIRU-VNTR and spoligotyping which targets polymorphism of short repeats distrubiting randomly in genome, Hsp65 and IS6110 regions had beentested. In such studies made, it is concluded that the discriminative power of these methods is lower if they are used lonely in contrast to combined use. In our previous studies some of these methods have been tested in our labarotories to determine the epidemiological properties of M. Tuberculosis strains isolated from pulmonar tuberculosis patient sand presence of Beijin strain had been demonstrated. In this study the possible contribution to epidemiologic studies of high discriminative power which will be obtained by combining 3 methods will be concluded in addition to questioning of relations between *M. Tuberculosis* strains with IS6110-RFLP, 15 locus MMIRU-VNTR and spoligotyping. With in this project; the sputum samples which sent to C.U.T.H.A.U.M. Regional Tuberculosis Lab. And grown on liquid and solid culture media and diagnosed as *M. Tuberculosis* complex members with commercial card tests will be examined for phylogenetic relations and will be diagnosed in species level with IS6110, MIRU-VNTR and spoligotyping methods.

Keywords: IS6110, MIRU-VNTR, *Mycobacterium tuberculosis*, Spoligotyping

1.GİRİŞ

Tüberküloz (TB), morbidite ve mortalitesi oldukça yüksek, insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyon yapan yedi bakteri türünden oluşan *M.tuberculosis* kompleksinin (MTK) neden olduğu ülkemizde ve tüm dünyada halen önemini koruyan bir hastalıktır^{1,2}.

Akciğer tüberkülozu 1995-2011 yılları arasında 51 milyon insan başarılı şekilde tedavi edilmiştir ve 2011 yılında yaklaşık 8-9 milyon yeni TB vakasının ortaya çıktığı, 1.4 milyon insanın tüberkülozdan öldüğü tahmin edilmektedir (DSÖ 2012 raporu). Asya küresel vakaların %55'ini, Afrika ise %31ini oluşturmaktadır. Küresel insidans 2003 yılı civarında pik yapmış ama şuanda stabilitesini korumuştur. Aynı zamanda izoniyazid (INH) ve rifampine (RIF) direnç gösteren çoklu ilaç dirençli (MDR) tüberküloz vakaları dünya çapında ortaya çıkmıştır. Dünya Sağlık Örgütü MDR-TB vakalarının 2006 yılında 500,000 civarında olduğunu tahmin etmektedir. Ayrıca izoniyazid, rifampin, florokinolon ve üç enjektabl ikincil ilaçlardan en az birine direnç gösteren geniş spektrumlu ilaç dirençli tüberküloz vakaları durumu daha kötü yapmaktadır. Yapılan araştırmalarda MDR-TB %8.32 ve XDR-TB prevalansı %0.68 dir. Dirençli suşların taşınmamasını en aza indirmek ve yayılımını kontrol altında tutabilmek için hızlı ilaç duyarlılık testleri yapılmalı ve tedaviye başlanmalıdır.^{3,4}

Tüberkülozun artan MDR ve XDR insidansı, tüberkülozun önemli global bir sağlık problemi haline gelmesine neden olmuştur. Çin kökenli, *M.tuberculosis* kompleksine ait MDR olup XDR gelişme riski oldukça yüksek seviyede bulunan Beijing suşları batı dünyasında da hızla yayılım göstermektedir. Bu nedenle *M.tuberculosis* kompleksi içinde bulunan tüm suşların tür düzeyinde tanımlanmaları dirençli suşların izlenmeleri ve yayılımlarının engellenmesi açısından hayati öneme sahiptir. Toplumu temel alan epidemiyolojik tüberküloz çalışmalarının amacı benzer izolatlarla özdeşleşen hastalar arasında olası taşınma zincirlerini takip etmek ve bu moleküler tiplendirme sonuçlarını kişilerle bağdaştırmaktır. Mikobakteriyel insersiyon (IS6110) dizilerine dayanan restriksiyon parça uzunluk polimorfizm(RFLP), polimeraz zincir reaksiyonuna(PCR) dayanan spoligotyping ve genomunda rastgele dağılım gösteren farklı sayılarda tekrarlayan dizilerin polimorfizmini hedef alan (MIRU-VNTR)

gibi temel olarak kullanılan üç moleküler metod vardır. Bu metodların her birinin avantaj ve dezavantajı vardır. IS6110-RFLP zaman alıcı, zahmetli ve yüksek standardize prosedür gerektirir ancak ayırım gücü yüksektir, spoligotyping ise ayırım gücü düşüktür. MIRU-VNTR nispeten yeni bir yöntemdir ama yapılan çalışmalar ayırım gücünün IS6110-RFLP'ye yakın olduğu göstermiştir. Ayrıca geniş topluma dayanan çalışmalarda spoligotyping ve MIRU-VNTR kombinasyonu hızı ve kolay uygulanabilirliği sayesinde yeni altın standart olma ihtimali yüksektir⁵.

Biz bu çalışmada Haziran 2011-Mayıs 2013 tarihleri arasında bölgemizdeki 8 ilde hizmet veren 21 Verem Savaş Dispanseri, 1 Göğüs Hastalıkları Hastanesi, 2 Devlet Hastanesi olmak üzere 3 yataklı hastaneden akciğer tuberkulozu şüphesiyle laboratuvarımıza gönderilen toplam 22.619 örnekten izole edilen *M.tuberculosis* kompleksine ait 110 MDR *M.tuberculosis* izolatının genotipik özelliklerini IS6110-RFLP, spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemleri ile araştırdık ve karşılaştırdık. Çalışmamızdaki öncelikli amaç bölgemizde bulunan *M. tuberculosis* izolatlarının genotip düzeyinde tanımlanması ve reinfeksiyonlarla reaktivasyonların tespitidir. Aynı zamanda ileride de devam edecek olan epidemiyolojik çalışmalar için gerekli olan laboratuvar alt yapısını oluşturmak, sürdürülecek genotiplendirme çalışmaları ile *M. tuberculosis* suşlarının bölgemizdeki hareketini takip ederek kontrol stratejileri geliştirmek ve mevcut stratejilerin işleyişini sorgulayabilir sonuçlar üretilmesine imkan sağlamak ise uzun vadeli beklentidir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Tarihi insanlık tarihi kadar geçmişlere dayandığı bilinen en eski bulaşıcı hastalılardan biri olan tüberküloz(TB) her yıl milyonlarca insanı tehdit etmekte, ülkemizde ve dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir.

Günümüzde AIDS ile birlikte benzer salgın segileyen tüberküloz, geçmişte çiçek, veba gibi hastalıklarla birlikte birçok salgınlara neden olmuştur. HIV epidemisi ile yeniden önem kazanan tüberküloz epidemisinde bir diğer önemli problemde çoklu ilaç direnci gösteren suşların popülasyondaki artışıdır⁶.

İnsanların mikobakterilerle ile ilk karşılaşmasının M.Ö. 8000 yıllarında yerleşik toplulukların sığırları evcilleştirmesiyle birlikte olduğu tahmin edilmektedir. M.Ö. 5000 yıllarında Almanya’da bulunan, insan iskeletlerinde asit ve alkole dirençli basiller saptanmış. Tüberküloza ait deliller M.Ö. 4000-2400’lü yıllarda eski Mısır’da Firavunlar zamanından kalma Thebes bölgesinde bulunan 85 mumyadan alınan organik materyallerden ARB, PCR ve IS6110- RFLP ile ispatlanmış, spoligotipleme ile de suş tayini yapılabilmektedir. Ayrıca yine bu dönemlere ait bulunan insan iskeletlerinde tüberkülozu düşündüren vertebra lezyonları (Pott hastalığı) ve psoas apseleri görülmesi, sanat eserlerinde bulunan figürlerde kemik lezyonlu hastaların tanımlanması bu dönemde tüberkülozun yaygınlığı göstermektedir^{6,7}.

M.Ö. 2700 yıllarına ait eski Çin kaynaklarında tüberkülozu düşündüren ifadeler bulunmaktadır. En iyi tüberküloz kanıtı, M.S. 700’lü yıllarda yaşayan, sekiz yaşındaki, İnkâ erkek çocuğu mumyasından elde edilmiştir. Mumyanın omurga grafisinde Pott hastalığına ait bulgular saptanmış ve lezyon yaymalarında aside dirençli basiller görülmüştür. Hipokrat (M.Ö. 460-377) hastalığı anlatan, erime ve tükenme anlamına gelen “phtisis” terimini kullanmış ve eski Yunan literatürüne tüberkülozu yerleştirmiştir. M.S. 2. yüzyılda yaşayan Galen ise 1000 yıl değişmeyecek tedavi önerilerini ortaya koymuştur. Bu öneriler istirahat, öksürüğün kesilmesi, göğüs yakıları, venden kan alımı, sülük uygulaması, kusturucular, müshiller, kabartıcı maddelerle ciltte yaralar oluşturmak şeklinde özetlenebilmektedir.

Rönesans döneminde gözlem ve deneylerin artmasıyla tüberküloz konusunda yeni bilgiler ortaya çıkmıştır. Andreas Vesalius (M.S. 1478) fitizisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonların bulunduğunu bildirmiştir. F. Syllivus (1614-1672) ise tüberkülozdan ölen hastaların akciğerlerinde küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstererek bunları “tüberkül” diye adlandırmıştır. Eski Avrupa’da da son derece yaygın olan tüberküloz 15-17 yüzyıllarında Avrupa Toplumunun %25’ini enfekte ettiği Litvanya’da toplanan kemik ve diş materyallerinde IS6110 RFLP yöntemiyle MTK’ine ait bakteri varlığının kanıtlanmasıyla ispatlanmıştır. 17. ve 18. yüzyıllarda sanayi devrimi, fakirlik, yetersiz beslenme ve kalabalık yaşam koşullarından dolayı bu şartlar tüberküloz salgınının genişlemesine neden olmuştur. Bu durum hastalığın İngiltere’den tüm batı ülkelerine yayılmasına yol açmış, batı Avrupalılar tüm dünyaya yayıldıkça tüberküloz da yaygınlık kazanmıştır. 19.yy hastalığın kavranmasında çok önemli gelişmelere sahne olmuştur: A. Willemin 1865 yılında tüberkülozlu hastaların kaviterlerinden alınan materyali tavşanlara inoküle ederek tüberküloz geliştiğini göstermiştir. Robert Koch 1882’de tüberkülozun *M. tuberculosis* basili ile oluşan bir infeksiyon olduğunu kanıtlamıştır^{6,7}.

İlk senatoryumun 1854 yılında Almanya’da açılmasıyla tüberküloz tedavisinde farklı bir yaklaşım başlamıştır. Kısa bir süre sonra tüm Avrupa’da ve ABD’de yaygınlaşan bu uygulamada dağ eteklerinde kurulan senatoryumlarda zengin bir diyet, hafif egzersiz, 8-12 saat taze dağ havası ile temas sağlanıyordu. Fakat hasta kadar Tb basilinin oksijenden faydalanması senatoryumların tedavide etkisiz, hatta zararlı olabileceği düşüncesiyle bu uygulamalardan vazgeçilmiştir⁸.

W. Roentgen’in 1895 yılında X ışınlarını buluşu ile sanatoryumlar bakteriyolojik ve fluoroskopik incelemelerin yapıldığı tüberküloz tedavi ve araştırma merkezleri haline gelmiştir. Yüzyılımızın başında tüberküloz tedavisine cerrahi kollaps tedavileri eklenmiştir. Yirminci yüzyılın ilk yarısında tüberküloz tedavisine egemen olan sanatoryum ve kollaps tedavisi yaklaşımı modern kemoterapinin başladığı 1950’li yıllardan itibaren giderek terk edilmiştir^{6,7,9}.

F. Seibert 1930’lu yıllardan sonra old tüberkülini saflaştırmış ve elde edilen saflaştırılmış protein türevi (PPD) ile tüberküloz infeksiyonun varlığı saptanmaya başlanmıştır. Calmette ve Guérin isimli araştırmacılar 1921 yılında Fransa’da ilk

tüberküloz aşısını yani Bacillus Calmette-Guerin (BCG)'i geliştirdiler ve bu aşı II. Dünya Savaşından sonra tüm dünyada yaygın olarak kullanılmıştır^{10,11,12,13}.

Osmanlı İmparatorluğu'nda 19. yüzyılın sonlarına doğru tüberküloz salgını görülmüştür. 1.Dünya ve Balkan Savaşları'ndaki yoğun yoksulluk nedeniyle Anadolu'ya yayılmaya başlayan hastalık, bu dönemde en sık görülen ölüm nedeni olmuş ve 1940'ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmıştır^{11,14}.

Tüberküloz tarihinde 1940'ların ortasında ABD'de streptomisinin ve İsveç'te PAS'ın bulunması ile yeni bir dönem başladı. İlaçların tek başına kullanılmasından dolayı bir ayda oluşan direnç gelişimi önce büyük hayal kırıklığı yaratmış ancak bu durum yeni ilaç bulma çabalarına ivme kazandırmıştır. INH'in 1952 yılında Robizek ve Selikof (ABD) tarafından bulunmasından sonra üç ilaçla 18-24 ay süren kombine tedavinin uygulanarak tüberküloz altı ayda tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir. Daha sonra 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB) ve 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur. Yetmişli yıllara gelindiğinde batı ülkelerinde tüberküloz sorununun artık bittiği düşünülüyordu. Ancak 1985 yılından itibaren bu ülkelerde tüberküloz insidansının ilk kez artmaya başlamasıyla hastalığın yeniden ortaya çıkması şaşkınlık yaratmıştır¹⁰.

Kayıtların yetersizliği nedeniyle 1950'li yıllar öncesindeki durum hakkında yeterince veri yoktur. Bu ülkelerde DSÖ tarafından önerilen ve erken tanı, tedavi ve aşılamaı öneren tüberküloz kontrol programları 1960'lardan sonra uygulanmaya başlanmıştır. 1960 yılında çıkan bir yasa ile verem savaş dispanserleri kurulmuştur^{7,12,13}.

Batı ülkelerinde 1970'lerde tüberküloz hastalığının kontrol altına alındığı düşünüldükçe kontrol programları gevşetilmiştir. Fakat HIV ile birlikte 1985 yılından itibaren TB insidansında yeniden artışlar kaydedilmeye başlanması bu ülkelerde 1960'lardan sonra uygulanmaya başlayan DSÖ tarafından önerilen ve erken tanı, tedavi ve aşılamaı öneren TB kontrol programlarının, 1990'lı yıllarda yetersiz olduğunu göstermiştir^{15,16}.

Başarılı bir tüberküloz kontrol programıyla birlikte bulaşların önlenmesi ve mortalitenin azaltılabilmesi için tedavi başarısı ve direnç gelişimi önemlidir. Bunları etkileyen iki önemli faktör; hasta uyumu ve ilaç direncidir. Tüberküloz kontrolünde istenen başarıyı sağlamak için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ); Dünya nüfusunun %55'ini

ve dünyadaki tüberküloz vakalarını % 27'sini içeren 148 ülkede “doğrudan gözetimli tedavi stratejisi (DGT-DOTS)” uygulamasını başlatmıştır¹⁷.

2.2. Mikobakterilerin Özellikleri

Mikobakteriler, Mycobacteriaceae ailesine bağlı tek genus olan Mycobacteriumlar içinde bulunmaktadır. Guanin ve sitozin (G+C) (%62-70) oranının yüksek olması ile mikolik asit içeren diğer bakterilere, Nocardia (%60-69), Rhodococcus (%59-69), ve Corynebacterium'lara (%51-59) benzerler.

Mikobakteriler katalaz aktifliği gösteren, aerop, sporsuz, kapsülsüz, silindirik şeklinde, hafif kıvrık veya düzgün çomak şeklinde kord oluşturabilen, 0.3-0.6 µm eninde, 1.0-10 µm boyunda ince basillerdir. Üreme ortamının şartlarına ek olarak basilin büyüklüğü ve şekli nedeniyle 12-18 saatte ikiye bölünerek yavaş üreme gösterirler. Optimum üreme şartları 5-6 pH ve %5-10 CO₂'dir. 37°C üreme için uygun bir sıcaklık olmasına karşın bu sıcaklık türden türe değişmektedir. Uygun şartlar altında 10-15 günde koloniler gözle görülmeye başlar. Basillerin birbirlerinden ayrılmayarak oluşturdukları bu yapı kord faktör (serpentine cord) olarak adlandırılır.

Yavaş üreyen türler pigment oluşturma özelliklerine göre farklı gruplar altında toplanırlar; pigment oluşturmayanlar(nonfotokromojenler), karanlık ve aydınlıkta pigment oluşturanlar(skotokromojenler), karanlıkta ürerken pigment oluşturmayıp, ışığa maruz kaldıkları zaman pigment oluşturanlar(fotokromojenler)^{18,19}.

Mikobakteriler gram (+) ya da (-) olarak sınıflandırılmaz. %95 etil alkol ve %3 hidroklorik asit (asit- alkol) mikobakteri hariç bakterileri dekolarize eder. Dolayısı ile “asit dirençli basil” olarak adlandırılır. Bunun nedeni hücre duvarındaki lipid düzeyinin yüksek olmasıdır. Lipid içeriği gram (+) bakterilerde %0,5, gram (-) bakterilerde %3 iken, mikobakterilerde %25'tir²⁰.

Hücre duvarlarının hidrofobik lipidlerce zengin olmasından dolayı gram bakterileri boyamada kullanılan anilin boyaların geçişine izin vermediği için Gram boyama yöntemi ile boyanamazlar. Gram boyaların hücre duvarından geçebilmesi ancak fenol veya ısı ile birlikte fenol uygulanması ile mümkündür(Kinyoun veya Ehrlich- Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemleri ile). Hücreye giren boyanın dekolorizasyonunda tek başına alkol kullanımı yetersiz olup %3'lük asit-alkol uygulanır, bu uygulamaya rağmen ilk boya hücre duvarında kalır. Çünkü mikobakteriler

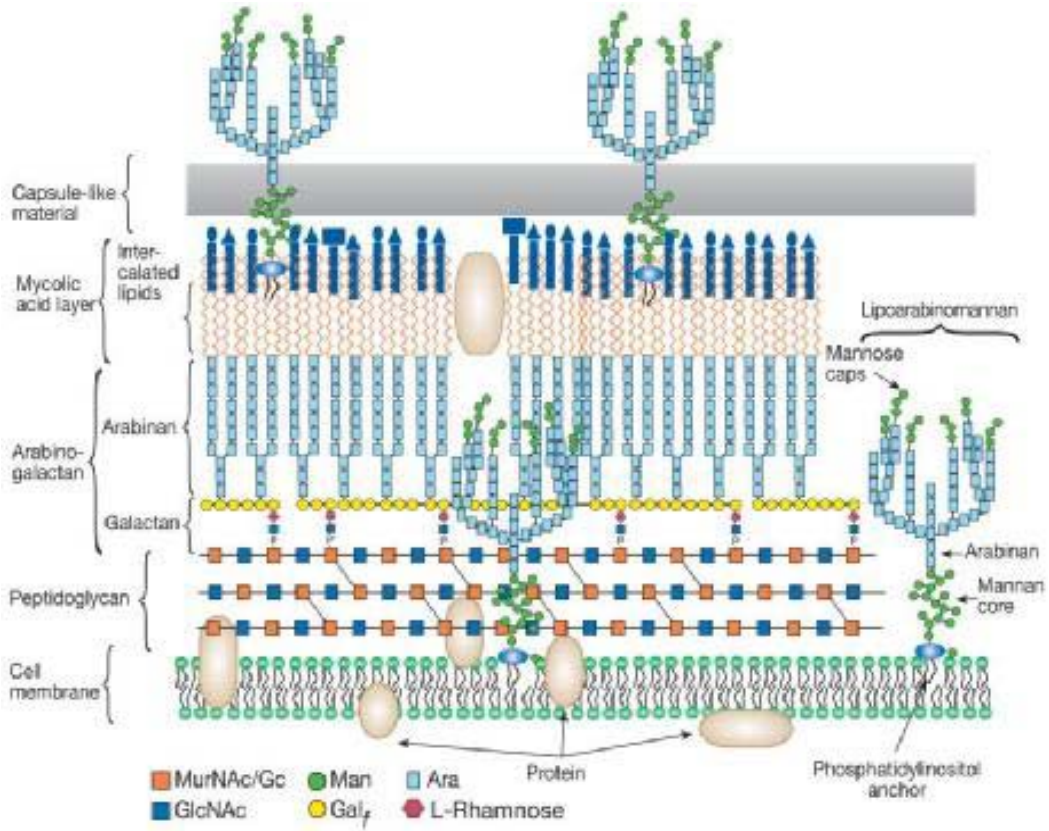
aside dirençlilik gösterirler ve bu özelliklerinden dolayı aside dirençli bakteriler(ARB) olarak da adlandırılırlar^{18,21,22}.

Kinyoun veya EZN boyama yönteminde dekolorizasyondan sonra zıt boya olarak metilen mavisi kullanılır ve mikroskop incelemesinde tüberküloz basilleri mavi zeminde kırmızı çomaklar şeklinde görülür, zincirler veya demetler oluşturabilirler^{23,24}.

2.2.1. Mikobakterilerin Hücre Yapısı

Mikobakteriler sitoplazma, plazma zarı ve bolca lipid içeren hücre duvarından oluşmuşlardır. Sitoplazmada bulunan bir kromozom çekirdek zarı ile çevrili değildir. Bu yüzden prokaryotturlar. Plazma zarına ait lipid yapısı tam bilinmemekle, kardiolipin, fosfatidiletanolamin ve monofosfoinositollerin bulunduğu gösterilmiştir^{25,26}.

M.tuberculosis'in hücre duvarı bilinen hücre duvarları arasında en kompleks yapıya sahip olanıdır. Bu yapılanma üç tabakdan oluşmaktadır; Plazma zarı üzerindeki iç tabaka peptidoglikandan (mürein) oluşmuştur. Bu tabaka kısa peptid zincirleri, çapraz bağlarla bağlanan polisakkarit zincirlerinden oluşur ve hücrenin sertliğini sağlar. Peptidoglikanın üzerinde bulunan ikinci yapı arabinogalaktan tabakası olup hücre duvarı kitlesinin %35'ini oluşturur ve peptidoglikan tabakasına fosfodiester bağlarıyla bağlıdır. Arabinogalaktanların yan zincirlerine mikolik asitler bağlanmıştır. Bu asitler hücre duvarı kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Kord faktörü oluşması bu mikolik asitlerin, trehaloz gibi bir şekerlere bağlanmasıyla oluşur. Dış tabaka ise bir grup heterojen peptidoglikolipidler veya fenolik glikolipidden meydana gelmiştir ve mikozidler olarak adlandırılırlar(Şekil1). Hücre duvarı ağırlığının %60'ını oluşturan lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitleridir^{21,22,24}.



Şekil 1. Mikobakterilerin hücre duvar yapısı¹⁶

2.3. Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Mikobakteriyum cinsi, Eubacteria üst aleminin, Firmicutes bölümünün, Actinomycetes sınıfının, Micobacteria takımından, Mycobacteriaceae ailesine dahil bu ailedeki tek cinstir^{22,27,28,29}.

Alem: Prokaryot

Bölüm: Firmicutes

Sınıf: Actinobacteria

Takım: Actinomycetales

Aile: Mycobacteriaceae

Cins: Mycobacterium

Tür: *Mycobacterium tuberculosis*

Bakteriyolojik özellik ve DNA benzerlikleri yönlerinden dolayı yakın ilişkili türlere ‘kompleks’ adı verilir ve *M.tuberculosis* kompleks olarak tanımlanır. *M.tuberculosis* kompleks içinde bulunan türler *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*’in alttürü olan *M. bovis* BCG, *M.africanum*, *M. microti*’dir. Bu grubun dışında kalan türler ise, Mycobacteria other than tuberculosis(MOTT) olarak adlandırılmıştır^{27,28,29,30}.

MOTT içerisinde bulunan türler ise *M.fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M.kansasii*, *M. smegmatis* ve *M. avium complex*’dir. *M.tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerin öneminin anlaşılmasıyla bu türlere olan ilgi artmıştır³¹.

Mikobakterilerin sınıflandırılmasında 1950’lerin sonlarına doğru Ernest Runyon, *M. tuberculosis* dışındaki MOTT (Mycobacterium Other Than Tuberculosis) türlerini üreme hızları, pigment üretimleri ve koloni morfolojilerini temel alarak fotokromojen, skotokromojen, nonfotokromojen ve hızlı üreyenler olarak Tablo1’de gösterilen dört gruba ayırmıştır. 1987’de Woods ve Washington bu sınıflandırmayı eksik bulmuş ve *M. tuberculosis*’i de içerisine alan klinikle uyumlu Tablo2’de verilen sınıflandırmayı önermişlerdir^{32,33}.

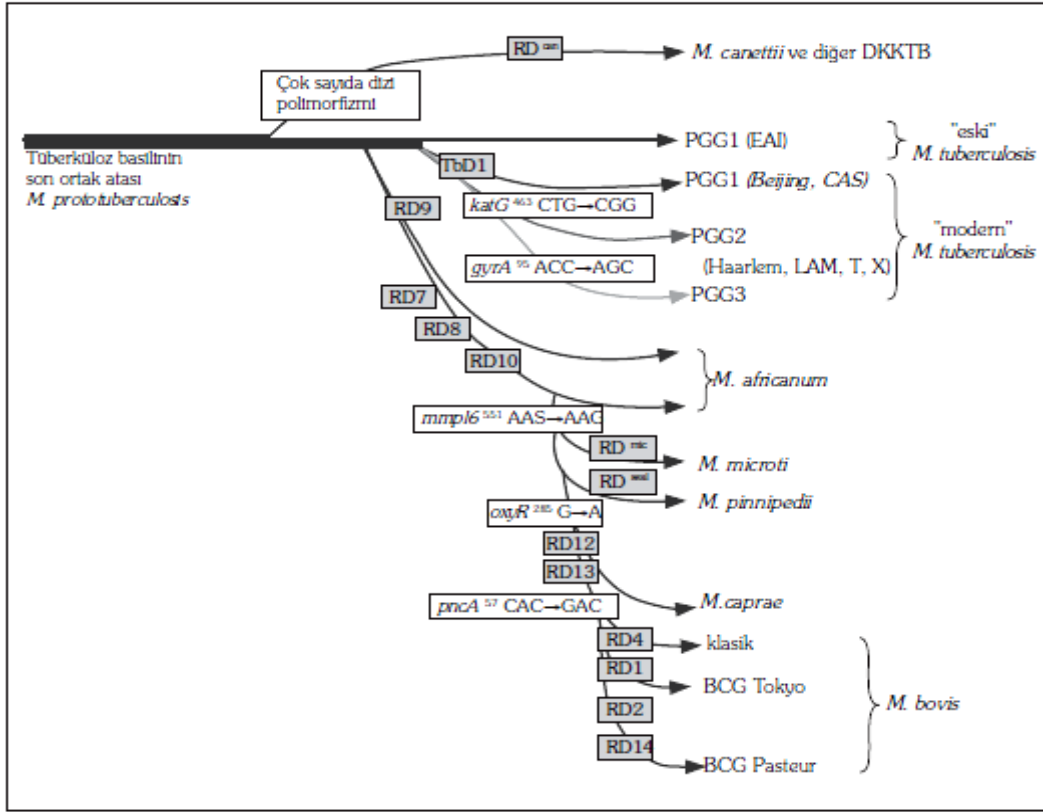
Tablo1.Runyon Sınıflandırması³²

Mycobacterium	Klinik belirti	Pigmentasyon	Üreme
Sınıflandırılmayan			
<i>M. tuberculosis</i>			
<i>M. ulcerans</i>			
<i>M. bovis</i>			
<i>M. leprae</i>			
Runyon Grup 1			
<i>M. marinum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i>	Genelde patojen	fotokromojen	yavaş
Runyon Grup 2			
<i>M. scrofulaceum</i>	Nadir patojen	skotokromojen	yavaş
<i>M. goodii</i> <i>M. xenopi</i>			
Runyon Grup 3			
<i>M. avium intracellulare</i>	Fırsatçı patojen	nonkromojen	yavaş
<i>M. avium</i> <i>M. haemophilum</i>			
Runyon Grup 4			
<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>	Nadir patojen	nonkromojen	Hızlı

Tablo2. Woods ve Washington sınıflandırması³³

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

Brosh ve arkadaşları (2002) ortak atadan köken alan mikobakterilerin evrimlerini genomlarındaki 10 adet restriksiyon ile kaybedilmiş “farklılaşma bölgeleri” (RD’s) olarak adlandırılan gen bölgeleri ile tek nükleotid polimorfizminin (SNP’s) belirlediğini ileri sürmüşler ve filogenetik oluşumu Şekil 1’de verildiği gibi göstermişlerdir.



Şekil 2. *M. tuberculosis* kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki³⁴

2.3.1. *M. tuberculosis* Kompleks (MTK)

MTK, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* ve *M. caprae* türlerinden oluşur. İnsanları ve hayvanları kapsayan patojenite gösterdiği geniş bir konak yelpazesi vardır. Üreme hızı, koloni morfolojisi gibi bir takım fenotipik özellikler ve DNA fingerprint teknikleri kullanılarak farklı üyelere ayrılmıştır³⁵.

2.3.1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Koch tarafından 1882 yılında bulunmuştur. İnsan tüberkülozunun en yaygın etkenidir ve damlacık yoluyla yayılır. *M. tuberculosis* bakterileri makrofajlar içinde yaşamlarını sürdürür, çoğalır ve stabilitesini de burada korur. *M. tuberculosis* TbD1 delesyonu ile atasal suştan ayrılmıştır. Atasal suş en yakın suş *M. canettii*'dir. RD ve

TbD1 bölgeleri tamdır. *M. tuberculosis*'in esas konağı insandır. Katı besiyerlerinde aerop ortamda, 37°C'de 2-4 haftada ürer. *M. tuberculosis* pigment oluşturmayan, sıvı besiyerinde kord faktör oluşturan, niasin pozitif, nitratları nitritlere indirgeyebilen, tiyofen-2-karboksilik asid hidrazid (TCH)'de üreyebilen, katalaz testi pozitif (INH dirençli türler dışında) ve 68 0C'de bu özelliğini yitirmekle birlikte p-nitro-asetilamino-hidroksi propiyofenon (NAP) içerir. Katı besiyerinde R tipi koloni oluşturarak ürer. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir. *M.tuberculosis* türü içerisinde PE, PPE ve özellikle SNP's ile farklılaşmış, genetik olarak homojen yapı gösteren, bazı insan grupları arasında, filocoğrafik ve epidemiyolojik olarak ayrılan alt tür suşları bulunmaktadır.

2.3.1.2. *M. bovis* ve *M. bovis* BCG

M. bovis esas olarak sığır tüberküloz nedenidir. Genellikle yabani ve evcil hayvanlar ile insanlarda enfeksiyona yol açar. Bulaşta sıklıkla süt ürünleri rol alır. Bundan dolayı başlangıç lezyonu AC'den çok servikal ve intestinal lenf nodüllerinde meydana gelir. Pastörize süt kullanımı ve tüberkülin reaksiyonu gösteren sığırların kesilmesi nedeni ile Amerika'da *M. bovis* türlerine bağlı enfeksiyonlar nadirdir. *M. tuberculosis* enfeksiyonuyla benzer klinik özellik gösterir. *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guerin) suşu, *M. bovis* sokak suşunun in-vitro şartlarda 230 defa pasajlanarak atenuasyonu ile elde edilmiştir. *M. bovis* katı ve sıvı besiyerlerinde, aerob şartlarda 6-8 haftada üretilir. Katı besiyerinde R veya S koloni yapar. Çoğunlukla niasin reaksiyonu vermez. Nitratları nitrite indirgemez. T2H'ya duyarlıdır, pirazinamidaz aktivitesi yoktur. Güçlü katalaz aktivitesi gösterir. Besiyerine piruvat eklenmesi üremesini artırır.

2.3.1.3. *Mycobacterium africanum*

İnsan TB etkeni bu heterojen grup ilk olarak 1968 yılında Afrika'da Senegalli bir hastadan izole edilmiştir. *M. africanum* fenotipik özellikleri dikkate alınarak *M. tuberculosis* ve *M. bovis* arasına yerleştirilmiştir. *M. africanum* subtip I (Batı Afrika) ve subtip II (Doğu Afrika) olmak üzere ikiye bölünmüştür. *M. africanum* subtip II *M. tuberculosis*' in alt dalı olarak kabul edilmiştir. Batı Afrika *M. africanum* iki dala (lineage) ayrılmıştır. Lineage 1'de RD711 bölgesi, lineage 2'de ise RD7, RD8, RD9, RD10, RD701 ve RD702 bölgeleri delesyona uğramıştır. Bu iki dal neredeyse Batı

Afrika'daki tüberküloz olgularının yarısından sorumludur. *M. africanum* insan konaklı patojendir, *M. tuberculosis* den daha düşük oranda izole edilir. Bu durum coğrafi sınırlılığa veya laboratuvar klasifikasyon eksikliğine bağlı olabilir. Mısır mumyalarında *M. africanum* ve *M. tuberculosis* DNA izole edilmiştir fakat günümüzde *M. africanum* Batı Afrika dışında nadiren izole edilmektedir. Dünyanın birçok ülkesine büyük göçlere rağmen *M. africanum*'un yayılım göstermemesi, *M. africanum*'un Batı Afrika'ya spesifik olarak yerleştiğini göstermektedir. Mikroaerofilik ortamda iyi ürerler. Nitratı indirgeyemezler. T2H varlığında üreyemezler. Pirazinamidaz aktiviteleri pozitifdir.

2.3.1.4. *Mycobacterium microti*

M. microti Wells tarafından 1937 yılında tarla farelerinde keşfedilmiştir. Özellikle küçük kemirgenlerde bulunur, ancak kedilerde, domuzlar ve lamalarda enfeksiyon oluşturduğu gözlenmiştir. *M. microti* çiftlik ve ev hayvanlarında enfeksiyon oluşturmaktadır. İnsanlarda patojen olmadığı bilinen *M. microti*'nin son zamanlarda çok nadir de olsa insanlarda enfeksiyonu bildirilmiştir. İnsandan insana bulaş ihtimali de oldukça düşüktür. Geleneksel yumurtalı katı besiyerinde zayıf üreme gösterirler. Sıvı kültür tekniklerinde daha hızlı ve bol miktarda ürerler. Fenotipik yöntemlerle *M. tuberculosis*, *M. africanum* veya *M. bovis*'den ayırımı zordur. *M. microti* suşları diğer MTK suşlarında gözlenenden farklı karakteristik IS6110 bant profili ve spoligotyping paterni göstermektedir. Lama-tipi ve sıçan-tipi olmak üzere iki Spoligotyping profili bulunmaktadır ve her iki tip de insan enfeksiyonları oluşturabilir. Hem immunkompetan hem de immunsupresif hastalarda enfeksiyon oluşturabilir. Ehrlich Ziehl Neeelsen (EZN) boyamasında ay çöreği görüntüsü tipiktir.

2.3.1.5. *Mycobacterium canettii*

M. canettii ilk olarak 1969 yılında Fransız bir çiftçiden Canetti tarafından izole edilmiştir. *M. canettii* neden olduğu bilinen tüm TB olguların Afrika boynuzu ile bağlantılı olduğu görülmüştür. *M. tuberculosis*'in oldukça nadir görülen varyantıdır. *M. canettii* izolatları düzgün, yuvarlak ve parlak görünümlü kolonileri bulunur. Diğer mikobakteriler ile aynı 16S rRNA dizilerine sahiptir. *M. canettii* suşları arasında house-keeping gen polimorfizmi, IS1081 kopya sayısı, koloni morfolojisi, hücre duvarının

lipid içeriği gibi birçok açıdan farklılıklar tespit edilmiştir. Düzgün koloni fenotipi stabil değildir, düzensiz koloni morfolojisine dönüşebilir.

Delesyon incelemesi sonucunda RD, RVD ve TbD1 bölgelerinin *M. canettii* genomunda korunduğu görülmüştür. Bu bulgu *M. canettii*'nin RD, RVD ve TbD1 oluşmadan önce MTK'nin ortak atasından ayrılmış olduğunu öne sürmektedir. Bu hipotez *M. canettii*'nin Direct Repeat bölgelerinde 26 unique spacer dizilim taşıması ve diğer MTK üyelerinin hiçbirinde bu uzunlukta spacer bölgenin bulunmaması ile desteklenmektedir.

2.3.1.6. *Mycobacterium pinnipedii*

Bu mikroorganizma ilk olarak Avustralya denizaslanları ve fok balıklarında gözlenen tüberküloz vakalarından izole edilmiştir. Daha sonra Güney Amerika'da aynı hayvanlardan ele geçmiştir. Fok balıklarından izole edilen suşlar sodyum piruvat içeren besiyerinde üreme göstermiştir. Ziehl-Neelsen boyamada gevşek kord formasyonu ve pirazinamid duyarlılığı ile *M. bovis* den farklılık göstermektedir.

2.3.1.7. *Mycobacterium caprae*

M. caprae ilk olarak İspanya'da keçilerden izole edilmiştir. MTK'nin diğer üyelerinden farklılıklar gösterir. Pirazinamid duyarlılığı gibi biyokimyasal ve epidemiyolojik özellikleri dışında gen (*pncA*, *oxyR*, *katG* ve *gyrA*) polimorfizm kombinasyonları ile MTK nin sıradışı bir üyesidir³⁶.

2.4. Antijenik Yapı ve Virulans Faktörleri

M.tuberculosis'in sahip olduğu granülom oluşturma, makrofaj aktivasyonu, immüno süpresyon, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi değişik özellik ve etkileri bulunan proteinler, lipidler ve polisakkaritler immünojenik özellik göstermektedir³⁷.

2.4.1. Mikobakteriyel proteinler

2.4.1.1. Old Tuberkülin (OT)

Önceleri interdermal cilt testlerinde kullanılan, ilk kez Koch tarafından elde edilmiş tüberküloz basillerinin kültür ekstraktı olarak bilinen OT, sadece mikobakteriyel proteinler içermemesi nedeniyle safalştırılmasına gerek duyulmuş ve PPD'nin gelişimine olanak sağlamıştır^{22,37}.

2.4.1.2. Saflaştırılmış protein derivesi(Purified Protein Derivative-PPD)

İlk kez Seibert ve Glenn tarafından tanımlanan, OT'ye kollodyon membranlardan süzdürme ve amonyum sülfatla çöktürölme gibi işlemler uygulandıktan sonra elde edilmiş daha saf bir üründür. Diğer mikobakterilerle çapraz reaksiyon vermesi ve tamamen saflaştırılamaması gibi dezavantajlarına rağmen immünodiagnostik önemi hala mevcuttur. DSÖ tarafından kullanımı kabul edilen deri test maddesidir ancak PPD testi kişinin aktif tüberkülozlu olup olmadığından çok tüberküloz bakterileri ile karşılaşp karşılaşmadığını gösterir^{22,37,38}.

2.4.1.3. Isı Şok Proteinleri-HspX (65Kda, 38 Kda, 12 Kda)

Şaperon benzeri proteinler olup konağın Th1 cevap oluşturmaları ve koruyucu immunité geliştirmesini sağlar. Farklı çeşitleri olup tüberküloz basilinin dormant fazda hayatta kalması, apoptozdan korunmasını sağlar^{37,39}.

2.4.1.4. 65 kDa Protein

Saflaştırılmış proteinler arasında en ilgi çeken antijendir. Isı şok proteinlerine çok benzer özellik gösterip yüksek derecede immunojeniktir. Konak hücrede salındığı zaman kazeifikasyon nekrozu ve otoimmün reaksiyonlara yol açtığı ve ayrıca bu antijene karşı oluşan antikorlar ve duyarlı T hücrelerinin varolduğu gösterilmiştir³⁹.

2.4.1.5. 19 kDa Lipoprotein

Hücre duvarı proteinidir. MHC-I'in antijen bağlantısını ve nitrojen ara ürünlerinin üretimini inhibe etme gibi işlevlerinin yanı sıra tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-12 sentezini azaltmaktadır. IL-12 sentezinin azalması T lenfosit

aktivasyonunu inhibe eder. Buna ek olarak interferon gama (INF γ) sentezini kodlayan genleri ve makrofajların INF γ reseptörünü inhibe eder⁴⁰.

2.6.1.6. ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein)

ESAT-6 RD1 bölgesinden kodlanmaktadır. T hücreleri üretimi ve INF γ salınımını indükler. Bu proteinlere karşı oluşan INF cevabını, T hücre sayısını göstererek in vitro ölçebilen kitler yapılmıştır⁴¹.

2.4.2. Mikobakteriyel Lipidler

2.4.2.1. Lipoarabinomannan

M. tuberculosis'in hücre duvar yapısında bulunan lipoarabinomannan (LAM) konağın tirozin fosfatını etkinleştirir. Eğer ölü M. tuberculosis'in fagositozu sırasında TK aracılığı ile sfingozin kinaz etkinleşirse, LAM aracılığı ile tirozin fosfat uyarılarak sfingozin kinazın durdurulmasına neden olmaktadır⁴².

2.4.2.2. WaxD

Freud's adjuvanının etkisini arttıran, peptidoglikolipid yapısındadır⁴².

2.4.2.3. Trehaloz-6,6 Dimikolat(Kord Faktör)

Tüberküloz basillerinin küme oluşturmalarını sağladığı için aynı zamanda kord faktörü olarakta bilinen önemli bir virulans faktörüdür. Alternatif kompleman yolunu aktive etme, polimorfnükleer lökosit göçünü engelleme gibi özelliklerinin yanı sıra granülom oluşumundada rol oynar. Konak hücre mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasara yol açar^{42,43}.

2.4.2.4. Sülfolipidler (Sülfatidler)

İçeriğinde sülfür bulunan glikolipidlerdir. Makrofajlarda meydana gelen fagozom-lizozom füzyonunu engeller, bakteriyi lizozom enzimlerinden korur ve kord faktörünün toksik etkisini arttırır^{42,43}.

2.4.2.5. Fosfatidil İnozitol Mannozyd (PIM)

Çapraz koruyucu immünitede rolü olduğu düşünülen, lipid yapıda olup esasen haptten özelliğe sahiptir^{42,43}.

2.4.3. Mikobakteriyel Enzimler

MTB enfeksiyonlarında ve bakterinin çoğalma sürecinde metabolizmasının ihtiyac duyduğu karbonhidratlar, aminoasitler, pürin-pirimidinler ve eser elementler gibi esansiyel metabolitler ve kofaktörleri ürettiği ortamdan sağlar. Ayrıca makrofajlardaki oksidatif strese karşı korunmak üzere antioksidan enzimler üretirler. Mutasyon çalışmaları bu enzimlerin enfeksiyonun sürekliliği ve virulans için gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu enzimlerden en önemlileri; izositrat liyaz (Icl), lipaz/esteraz (LipF), açıl-CoA sentaz (FadD33) ve fosfolipaz C gibi lipid metabolizması ile ilişkili enzimler, isopropilmalat izomeraz (LeuD), antranilat fosforibozil transferaz (TrpD), pyrolin-5-karboksilat redüktaz (ProC) ve 1-fosforibozil aminoimidazol-süksinokarboksamid sentaz (PurC) gibi aminoasit ve pirolin sentezinde rol oynayan enzimler, Nitrat redüktaz (NarG), katalaz-peroksidaz (KatG), alkil hidroperoksid redüktaz (AhpC), demir ile güçlendirilmiş süperoksit dismutaz (SodA) ve Cu, Zn ile güçlendirilmiş süperoksit dismutaz (SodC) gibi solunum enzimleri ile metal transferazlardır⁴⁴.

2.4.4. Transkrip Regülatörleri

Gen transkripsiyonunu regüle etmek amacı ile bulunan regülatörler, mikroorganizmanın bulunduğu ortamdaki şartları düzenler. Başka patojenler gibi *M.tuberculosis*'te de görülür. Radikal değişimleri düzenleyen bu genlerin housekeeping genlerin ekspresyonunu düzenleyen sigma A, insanda latent enfeksiyonların oluşumunda metabolizmayı bazal düzeye taşıyan Sigma F, dış ortamdaki ısı artışı veya dezenfektanların varlığını algılayarak gen düzenlemeleri yapan sigma E, oksidatif strese cevap olarak ekspresyonu artan sigma H gibi sigma gibi çeşitleri vardır. Bunlarla birlikte virulans genlerinde ekspresyonun düzenlendiği ve makrofajlar içerisinde çoğalma ile ilişkili cevap regülatörlerinin ve başka transkripsiyonel regülatörlerin virulansı ile ilişkili oldukları yine mutasyon ve atenuasyon bazlı çalışmalarla gösterilmiştir⁴⁵.

2.5. Patogenez, Patoloji ve Klinik Tablo

2.5.1. Klinik Tablolar

Tüberkülozda semptomlar sinsi bir başlangıç gösterir. Primer tüberkülozda gelişen primer lezyon ve hiler adenopati genellikle semptom ve bulgu oluşturmaz. En sık görülen semptomlar ateş, öksürük, kilo kaybı ve gece terlemesidir. Ancak bu semptomlar daha çok büyük çocuk erişkinlerde görülür. Küçük çocuklarda ise 4haftadan daha uzun süren kilo alamama, 2-3 ay ve daha uzun süren kuvvet kaybı, terleme, öksürük, wheezing, bir haftadan daha uzun süren açıklanamayan ateş ve effüzyon bulguları görülebilir. Aşırı duyarlılık reaksiyonu nedeni ile enfeksiyonunun 3-8. haftalarında eritema nodozum görülebilir. Sekonder tüberkülozda ise en sık görülen semptomlar; iştahsızlık, yorgunluk, kilo kaybı, öğleden sonraları çıkan ateş, gece terlemeleridir. Bu semptomlar yavaş gelişir, hasta tarafından iyi tolere edilir ve genellikle önemsenmez. Solunum sistemi ile ilgili semptomlar hastalığın ilerlediğini gösterir. En sık görülen semptom öksürüktür. 3 haftadan uzun süren öksürük ve hemoptizi olan hastalarda tüberkülozdan kuşulanmalı ve tüberküloz araştırılmalıdır. Göğüs ağrısı genellikle parietal plevra tutulumu sonucu; spontan pnömotoraks nedeni ile bazen öksürüğe bağlı kas zorlanması, bazen de kosta kırıkları nedeni ile gelişebilir. Yaygın akciğer parankimi tutulduğunda dispne gelişebilir. Tüberküloza özgü fizik muayene bulgusu yoktur. Bu hastalar soluk ve hasta görünümde, kilo kaybı nedeni ile zayıftırlar. Plevral kalınlaşma veya plörezi varsa matite ve yerel titreşimde azalma tespit edilebilir. Küçük hava yollarında gelişen kalıcı yapısal bozukluk nedeni ile ape lezyonlarda konsolidasyona bağlı bronşial ses duyulabilir. Yerel tüberküloz bronşiti veya büyümüş lenf bezinin bronşlara basısı nedeni ile yerel wheezing duyulabilir. Yaygın lezyon varlığında çomak parmak gelişebilir³⁰.

2.5.1.1. Primer Tüberküloz

Bulaştırıcı özellikte balgam yayması pozitif tüberkülozlu hasta ile karşılaşan *M.tuberculosis* ile daha önce karşılaşmamış PPD negatif bireylerin %30'unda klinik ve radyolojik bulgu olmamasına rağmen PPD pozitifleşir. Alveollere ulaşan damlacıklar ile taşınan *M. tuberculosis*, konağın ilk savunma mekanizmasını yenerek hayatta kalır ise; akciğer parankiminde pnömoni odağı (Ghon odağı), komşu hiler lenf bezinde

granülomatöz inflamasyon ve bu iki oluşum arasındaki lenfanjit ile karakterize primer kompleksin (Ranke kompleksi) meydana gelmesine neden olur. Primer enfeksiyon da denilen bu süreç hücrel immün yanıt gelişimiyle durdurulur ise, hastalık oluşmadan olay sonlanır. Eğer konağın immün yanıtı yetersiz kalırsa primer odak ve ilgili lenf bezindeki inflamasyon ilerler, primer tüberküloz meydana gelir. Bakteriler immün sistem hücreleri tarafından tamamen yok edilemeyip yıllarca canlılığını koruyarak sessiz (dormant) kalırlar²².

2.5.1.2. Miliyer Tüberküloz

Primer enfeksiyon sırasında kazeöz bir odağın damara açılması veya erken hematojen yayılımı sırasında damarlara yerleşen basillerin kana karışması miliyer tüberkülozun gelişmesine neden olur. 0 ile 4 yaş arasındaki çocuklarda immün sistem zayıflığı nedeni ile primer enfeksiyonun erken komplikasyonu olarak görülebilir²².

2.5.1.3. Sekonder Tüberküloz

Primer enfeksiyon sonrası latent halde kalan basillerin çoğalmaya başlaması ile sekonder tüberküloz gelişir²².

2.5.1.3.1. Endojen Reaktivasyon

Primer enfeksiyon sırasında akciğerin apikal-subapikal bölgelerine yerleşen (Simon odağı) ve latent halde kalan basillerin hayatın herhangi bir döneminde hücrel immün yanıtta meydana gelen supresyon nedeniyle aktif hale geçmesi ile meydana gelir^{22,47}.

2.5.1.3.2. Ekzojen Reinfeksiyon

Önceden primer enfeksiyon geçirmiş bireyin, basil yayan aktif tüberkülozlu bir hastadan çok sayıda virülen basil alması ile meydana gelir^{22,46,47}.

2.5.1.4. Ekstrapulmoner Tüberküloz

Tüberkülozun akciğer dışında ki odaklarda (plevra, perikard, kemik, böbrek, genital, gastrointestinal, merkezi sinir sistemi) meydana gelmesi durumudur⁴⁶.

2.6. Konağın Savunma Mekanizması ve İmmun Cevap

Tüberküloz, çok sayıda antijene ve farklı virülans faktörü içeren *M.tuberculosis* basili ile birlikte konağın mononükleer fagositleri ve T lenfositlerine bağlı olarak gelişen kronik granümatöz bir enfeksiyon hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyon veya hastalığın oluşup oluşmaması, konağın direnci ile basilin virulansı arasındaki dengeye bağlıdır. Tüberküloza karşı yanıtta doğal ve kazanılmış immunité rol oynamaktadır^{48,49}.

2.6.1. Doğal İmmun Cevap

M.tuberculosis basilleri alveollere ulaştığında doğal savunma yollarıyla yok edilebilir ya da çoğalıp klinik görünüm oluştururlar. Konağın doğal savunmasında ÜSY fiziksel engeli, fagositoz, inflamatuvar hücreler ve sitokinleri, mast hücreleri dentritik hücreler rol oynamaktadır.

2.6.1.1. Makrofajlar

Alveollere ulaşan basiller makrofajlar tarafından fagosit edilir ve burada replikasyonları ile metabolizma hızını düşürerek latent hale gelirler. Fagositoz çeşitli reseptörler aracılığı ile sağlanır (CR1, CR3, CR4). CR3 yokluğunda insan makrofajları ve monositleri tarafından basillerin fagositozu %70-80 azalır. Tüberküloza karşı konak cevapları (tablo3) ve buna karşılık mikobakterilerin fagositoza karşı savunma mekanizmaları bulunmaktadır (tablo4)^{48,49}.

Tablo3. Tüberküloza karşı konak cevabında makrofajların rolü⁴⁸

1. Basilin makrofaj yüzeyine bağlanması (kompleman reseptörleri: CR1, CR3, CR4; mannoz reseptörleri; surfaktan protein reseptörleri; CD14; toplayıcı reseptörler)
2. Fagozom-lizozom birleşmesi
3. Basil üremesinin önlenmesi (ROI ve RNI yapımı; apoptoz)
4. Diğer bağışıklık hücrelerinin toplanması ve bölgesel inflamasyon yanıtı (sitokinlerin etkisi: TNF- α , kemokinlerin etkisi: İL-8; antijen sunumu)

Tablo4.Fagositoza karşı mikobakterilerin savunması⁴⁹

1. Fagozom-lizozom birleşmesinin önlenmesi
2. Fagolizozomdan sitoplazmaya kaçış
3. Lizozom içeriğinin alkalizasyonu
4. ROI'nin inhibisyonu(katalaz üretimi ve kalın lipid duvar)
5. iNOS gen aktivasyonunun baskılanması
6. Lizozomal enzimlere direnç(hücre duvarı yüksek mol ağırlıklı lipidleri aracılığıyla)
7. Makrofajlarda CD1 ve Fas molekül yapımının baskılanması
8. Makrofaj aktive edici moleküllerin yapımının önlenmesi
9. Metabolizma veya hücre döngüsünün durdurulması

2.6.1.2. Nötrofiller

Nötrofiller kemokinlere karşı verilen ilk cevapta rol oynamaktadır. Surfaktan protein A (Spa-A) ya makrofaj tip II'lere ya da nötrofillere bağlanarak basillerin alımını sağlar. Bununla birlikte nötrofil aktivitesinde bozukluk olan bireylerde herhangi bir tüberküloz duyarlılığına rastlanmamıştır⁴⁸.

2.6.2.Kazanılmış İmmun Cevap

2.6.2.1. Humoral İmmun Cevap

Tüberküloz basili hücre içi patojen olduğu için humoral immün cevap eradikasyon zamanında tek başına yeterli olamamaktadır. Enfeksiyonun ilk zamanlarında antikorlar, opsonizasyon, kompleman aktivasyonu, sitokin cevabının artırılması, antikor bağımlı sitotoksiste, artmış antijen sunumu sayesinde tüberküloz basilinin özellikle mukozal yolla alınmasını önleyebilmektedirler⁵⁰.

2.6.2.2. Hücresel İmmun Cevap

M. tuberculosis uzun yıllar lanent halde kalabilsede immünitesi sağlam olan bireyler tüberküloz enfeksiyonunu efektif bir şekilde kontrol altında tutarlar⁵¹.

2.6.2.2.1. Sitokinler

Sitokinler aktif bir şekilde immün cevabı kontrol ederler. Lökositlerin migrasyonu ve granümatözün başlaması kemokin ve proinflamatuvar sitokinlerle gerçekleşir. Enfekte makrofajlar IL-12 salgılayarak Th1 hücrelerinden IFN- γ salınımını

sağlamakla, IL-10 ve IL-4'ün azalmasına neden olurlar^{49,50}.

TNF- α ve IFN- γ sinerjistik etkilidirler, makrofajların aktivasyonu ve makrofajlardan İNOS salınımı, reaktif nitrojen metabolitleri ve oksidatif moleküller oluşturmalarıyla mikobakteriyel enfeksiyonu sınırlandırır. Genellikle patojen ve konak arasındaki dengenin bozulma riski TNF- α seviyesinin düşmesiyle artmaktadır. TNF- α aynı zamanda kemokin reseptörlerinin ekspresyonunu ve kemokin salınımını da regüle eder^{50,51}.

2.6.2.2.2.CD4+ Hücreleri

CD4+ T hücreleri tüberküloz enfeksiyonun her aşamasında önemlidir. Lenf düğümlerinde CD4+ yardımcı T lenfositlerle olgun dendritik hücreler etkileştiğinde CD8+ sitotoksik T lenfositler de işlevsel hale gelmektedirler. Makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücrelerin MHC-II molekülleriyle sunduğu antijeni tanıyan CD4+ yardımcı T lenfositler, IFN- γ ve çeşitli sitokinler salarak makrofajları aktive ederler. Böylece aktif makrofajların içerdikleri basilleri öldürme yetenekleri artar. HIV(+) hastalarda azalmış CD4+ Thücre sayısı hastalarda tüberküloz riski yüksek bir ihtimaldir⁵¹.

2.6.2.2.3.CD8+ T Hücreleri

CD8+ T hücreleride tüberküloz immün cevabında rol oynar. CD8+ T hücrelerinin sitokin üretimi ve enfekte hücrelerin lizisi ile bakteri ölümünü sağlarlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar M.tuberculosis'in doğrudan CD8+ T hücreleri ile öldüğünü göstermektedir⁴⁹.

2.7. Laboratuvar Tanı

Laboratuvar tanı yöntemlerinin amacı uygun materyallerde mikobakterilerin bulunup bulunmadığını göstermektir. Uygun tanı yöntemleriyle tüberkülozun kesin tanısı yapıp, örnekte mikobakteri mevcut ise patojen ve patojen olmayan türleri birbirinden ayırarak uygun tedavi yöntemlerinin uygulanması yapılır.

Tüberküloz basili balgam(3gün ard arda), açlık mide suyu, BAL, biyopsi, idrar, BOS, doku ve diğer vücut sıvılarında aranabilir. Laboratuara gelen örnekler normal flora içerdikleri ve taşınma işlemleri sırasında kontaminasyon riski bulunduğu için,

kontaminasyona neden olabilecek bakteri ve mantarları elimine etmek amacı ile dekontaminasyon işlemi uygulanır. Taşınma uygun bir şekilde sağlanmış ise steril bölgelerden alınan örneklerle (BOS) dekontaminasyon uygulamaya gerek yoktur.

En yaygın olarak kullanılan dekontaminasyon yöntemi, N-asetil-L-sistein %2NaOH(NALC-NaOH)yöntemidir. NALC mukolitik etki gösterirken, NaOH ise dekontaminasyon yapar.

2.7.1.Mikroskopi

Mikroskopik inceleme kolay, ucuz, sık kullanılan ve ayırma gücü yüksek olan bir yöntemdir. Preparatlar materyalden direk hazırlanabildiği gibi, dekontaminasyon işleminden sonra da santrifüj yapılarak (homojenizasyon) teksif hazırlanabilir. Hücre duvarlarının yüksek miktarda lipid içirmesi nedeniyle hidrofobik özellikte olup suda erimeyen boyalarla boyanamazlar. Boyama işleminin gerçekleşmesi için boyaların fenol gibi suda eriyebilen bir madde içerisinde çözünmesi, preparat üstünde uzun süre tutulması ve ısıtılarak uygulanması gerekmektedir. Mikobakteriler %3'lük asit alkole dirençli oldukları için, renk giderme işlemi esnasında aldıkları boyayı bırakmadıkları için ve zıt boya olarak metilen mavisi kullanılır. Bu bakteriler için başlıca iki boyama yöntemi bulunmaktadır bunlar; karbol füksin (EZN ve Kinyoun) veya florokrom (auramin-rhodamin)dir. Mikroskopi sırasında 100X immersiyon objektifinde mavi zemin üzerinde kırmızı çomaklar halinde görülürler⁵².

Değerlendirme yapılırken 300 mikroskop sahası tarandıktan sonra hiç basil görülmezse negatif denmelidir. Alanlar taranırken 1-2 basil şüpheli, 100 alanda 1-9 basil görülmesi (+), 10 alanda 1-9 basil görülmesi (++), her alanda 1-9 basil görülmesi (+++), her alanda 10 ve üzeri basil görülmesi (++++) olarak yorumlanmalıdır⁵³.

2.7.2.Kültür

Kültür yöntemleri tüberküloz tanısında altın standart olarak devam etmektedir. Mikobakteriyel kültür yöntemleri katı besiyerleri ve sıvı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Katı besiyerleri agar ver yumurta bazlı iki çeşiti bulunmaktadır. Petragani ve American Trudeau Society gibi katı besiyerleri dışında günümüzde en yaygın kullanılan katı besiyeri, Löwensterin-Jensen(LJ)'dir. İçeriğinde patates unu, gliserol, tuz, yumurta bulunmasıyla kontaminasyonu engellerken aynı zamanda tüberküloz bakterisi için

uygun üreme şartlarını sağlar. En çok tercih edilen agar bazlı besiyerleri ise Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11'dir⁵².

Sıvı besiyerlerinin, MB Redox, BACTEC460TB, MGIT960, BACTEC900MB, ESPII, MB/BacT ALERT 3D gibi çeşitleri bulunmaktadır. MB Redox genellikle düşük kapasiteli laboratuarlarda tercih edilen manuel bir sistemdir. Mikobakterilerin izolasyonu amacıyla modifiye Kirchner besiyeri kullanılır. İçerisinde tetrazolium tuzu bulunması mikobakterilerin redoks sistemi sayesinde yüzeylerinde biriken pembe-kırmızı renklerinde formazona indirgenir. Üreme sonucu oluşan renkli mikrokoloniler makroskobik olarak görülür⁵³.

BACTEC 460 TB radyometrik bir sistem olup yarı otomatizedir ve bu sistemde izolasyonun yanı sıra, *M. tuberculosis* kompleksi ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (MOTT) ayrımı yapılabilmekte ve *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı çalışılmaktadır. BACTEC 460 TB içlerinde ¹⁴C işaretli palmitik asit içeren BACTEC 12B (M 7H12) ve BACTEC 13A (M 7H13) besiyerlerinden oluşur. Mikobakterilerin palmitik asiti kullanmaları sonucu ¹⁴CO₂ oluşur. Bunun sonunda oluşan üreme indeksi (GI), mikobakterileri tespit etmemizi sağlar. Sistemin dezavantajları ise kontaminasyon fazlalığı, oluşan kolonilerin morfolojilerinin görülememesi, pahalı olması, rayoizotop atıklar ve enjektörün yaygın kullanımı sonucu oluşan laboratuvar kazalarıdır^{52,53}.

MGIT960 sistemi modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bulunan tüplerden oluşur. Bu sistem temelde, tüpün tabanındaki silikona gömülü oksijene bileşik durumda olan floresan veren indikatör (fenetrolin rutenyum klorid pentahidrat), mikobakteri tüpteki oksijeni kullandığında bu indikatörün ışıma yapmasına ve ışımanında cihaz tarafından otomatik olarak okunmasına dayalıdır⁵².

BACTEC 9000 MB oksijen kullanımına duyarlı floresan temelli otomatize bir sistemdir⁵³.

ESP II tam otomatize bir sistem olup, selüloz, sünger ve M 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistem mikroorganizmaların üremesiyle meydana gelen gaz basıncı değişikliği ölçümlerine göre değerlendirme yapar²¹.

MB/BacT ALERT 3D besiyerinin tabanında kolorimetrik bir sensör içeren ve oluşan CO₂ seviyesine göre üreme değerlendirmesi yapan, bilgisayar destekli, besiyerlerinin sürekli kontrol altında tutulduğu tam otomatize bir sistemdir^{52,53}.

2.7.3. *M.tuberculosis* Kompleksinin İdentifikasyon

Hastaların doğru tedavisi ve toplum sağlığı açısından kültür işlemleri bittikten sonra izole edilen mikobakteriler tür düzeyinde tanımlanmalıdır. Bu tanımlamalar için farklı yöntemler ve bu yöntemlerin çeşitleri vardır.

2.7.3.1. Biyokimyasal yöntemler

Mikobakterilerin gruplandırılmaları üreme sıcaklıkları, üreme süreleri, koloni morfolojileri, oksijen kullanımı ve pigment özelliklerine göre yapılır. Bunun sonucuna göre farklı türler için uygun olan biyokimyasal testler vardır. Bunlar niasin, nitrat redüksiyon, katalaz, pirazinamidaz, Tween 80 hidroliz, arilsülfataz, üreaz testleri ve PNB(p-nitro benzoik asit) içeren besiyerinde üreme, TCH ile üremenin inhibe edilmesi, tellurit redüksiyonu, NaCl tolerans deneyi ve krsital viyolesiz MacConkey agarda üremedir⁵⁴.

2.7.3.2. BACTEC NAP Testi

MTK'nın üremesini inhibe eden fakat MOTT türlerine bir etkisi bulunmamasıyla sınırlı identifikasyon olanağı oluşturan bir takım kimyasal maddeler kullanılmaktadır(p-nitrobenzoat, hidroksilamin hidroklorür,NAP).Bu kimyasal maddelerden NAP, kloramfenikol sentezlendiğinde ara üründür. Genellikle BACTEC 460 TB sistemlerinde kullanılmaktadır.⁵⁴

2.7.3.3. Moleküler Yöntemler

Kültürde üreyen mikobakterilerin hızlı bir şekilde tür düzeyinde tanımlanmaları için diğer yöntemlerle birlikte moleküler yöntemlerin uygulanması daha kesin sonuçlar verecektir. Böylelikle hastalığın, daha patojen olan türlerin bulaşları ve yayılımlarının gözlemlenmesi, olguların kaynağı ve laboratuarlarda meydana gelen çapraz kontaminasyonlar ile reaktivasyon-reinfeksiyonun farkını anlama olanağı sağlamaktadır. 16S rRNA, 23S rRNA, Hsp65,16S-23S rRNA ara bölgesi, IS6110, doğrudan tekrar(DR), mycobacterial interspersed repetitive units(MIRU) gibi gen bölgeleri amplifikasyon yöntemleri ile çoğaltılıp, prop hibridizasyon, dizi analizi, Microarray, RFLP, spoligotiplendirme, MIRU-VNTR gibi yöntemlerin tek başlarına ve çeşitli kombinasyonlarıyla cins ve tür düzeyinde identifikasyon yapılabilmektedir⁵⁵.

2.7.3.3.1. IS6110-PCR-RFLP(Restriction fragment length polymorphism)

M. tuberculosis 0 ile 25 arasında kopya sayılarında tekrarlayan yerleşim dizilimi(IS) bölgeleri içerir. Bu yerleşim dizilimlerinin farklı çeşitleri bulunmaktadır; IS6110, IS8110, IS1547 ve IS-like'tır ve en yaygın kullanılanı IS6110'dur. RFLP altın standart olarak kabul edilmektedir. Burada DNA'da bulunan IS6110 bölgeleri *PvuII* restriksiyon endonükleazı ile kesilmekte, daha sonra DNA fragmentleri jel elektroforezi ile ayrılır ve ardından jelde bulunan DNA'lar southern blotting tekniği ile naylon membrana taşınır. DNA membrana hibridize olduktan sonra IS6110 prob ve kemilüminesan kit aracılığı ile görülür hale getirilir. Meydana gelen ışıma film üzerine aktarılıp yorumlaması yapılır⁵⁵.

Yüksek ayırım gücüne sahip olmasının yanı sıra, yoğun miktarda koloni ve DNA ihtiyacı, uzun zaman alması ve emek istemesi RFLP'nin dezavantajlarıdır. Kopya sayısı 5 ve altında olan suşlarda yetersiz ayırım gücü bu yöntemin spoligotiplendirme, MIRU-VNTR ve SNPs yöntemleriyle kombine edilerek avantaja dönüştürülebilir⁵⁵.

2.7.3.3.2. Spoligotyping(Spacer oligonucleotide typing)

MTK DR lokusu CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-düzenli kümelenmiş spacer arası kısa palindromik tekrarlar) ailesi üyesidir⁵⁶.

Kromozomal DR lokusunda bulunan polimorfizmi göstermeye dayalı bir yöntemdir. DR'leri hedef alan primerler kullanılarak bu lokusların arasındaki farklı spacerlar (ayırıcı yerler) amplifiye edilmektedir. Aplikon, membranda bağlı bulunan ve DR'ler arasında yerleşmiş olan farklı spacer bölgelere karşılık gelen 43 çeşit oligonükleotit proba hibridize edilmektedir. Spacerların varlığı veya yokluğu dijital ortamda gösterilir. Meydana gelen görüntü membranın üst yüzeyinde kareler halindedir. Spacerlar suşlar arasında farklılık gösterir ve suşlar spoligotipleme patternleri sayesinde ayırteilmektedir. Basit, hızlı ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bu yöntem, IS6110'dan sonra en yaygın olarak kullanılan metottur. IS6110'a göre avantajı düşük kopya sayılı suşlarda ayırım gücünün yüksek olmasıdır⁵⁷.

2.7.3.3.3. MIRU-VNTR (Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat)

MIRU-VNTR yöntemi değişik sayılarda sıralı tekrarlar(variable numbers of tandem repeats) içeren, *M. tuberculosis* tiplendirmesi için efektif, spesivitesi yüksek ve laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirliğinden dolayı standardize edilmiş hızlı bir yöntemdir. *M. tuberculosis* genomunda 41 farklı değişebilen sıralı tekrarlar (variable tandem repeats) tanımlanmış ve bunlara mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) adı verilmiştir. Bu lokusları içine alan komşu bölgeleri tanıyan primerler kullanımıyla yapılan PCR sonucu sıralı tekrarların sayısı ve bu sıralı tekrarların her iki yanında yerleşmiş olan DNA segmentlerinin büyüklüklerini belirlemektedir.

Bu metot ile suş tiplendirmede ilk 12 lokus MIRU-VNTR metodu kullanılmış ve daha sonra 15 ve 24 lokustan oluşan standart MIRU-VNTR formatları geliştirilmiştir.⁵⁸

MTK için duyarlı ve spesifik olan bu yöntem IS6110 RFLP ve spoligotipleme ile karşılaştırıldığında, daha yüksek miktarda ayırıcı profil oluşturmaktadır. European Union Concerted Action Meeting'e göre tüberküloz kontrolü ve epidemiyolojisi için yeni teknikler MIRU bazlı metotlardır⁵⁷.

2.7.4. Antimikrobiyel ilaçlar

Prevalansın düşük olduğu ülkelerde, reenfeksiyondan çok reaktivasyon görülmektedir. Bu sebepten ilaçla korunma önemli bir faktördür. İlaç verilerek PPD negatif kişilerin primer korunması sağlanarak, yeni basillerin PPD pozitifliğine ulaşmadan yok edilmesi amaçlanır. Sekonder korumada ise, PPD pozitif olan bireylerin ilaçla korunması ve inaktif basillerin reaktivasyon riskinin önlenmesi amaçlanır. Her iki korunma yönteminde de amaç latent durumdaki basillerin yok edilmesidir. Tedavide primer olarak kullanılan ilaçlar streptomisin, izoniazid, rifampisin, etambol ve pirazinamiddir.

2.7.4.1. İlaç Direnci

Tüberküloz basiline karşı az sayıda etkili ilaç bulunduğundan direnç gelişimi önemli bir tehdit unsurudur. İlaçlara karşı farklı direnç mekanizmaları oluşmuştur(tablo5). İzoniazid ve rifampine karşı oluşan direnç, çoklu ilaç direnci (MDR), sekonder ilaçlardan en az birine direnç geliştirmesi de geniş ilaç direnci

(XDR)olarak adlandırılmaktadır. Bu suşlarda yayılım görülmesi epidemiyoloji açısından sorun oluşturmaktadır.

M.tuberculosis’de diğer bakteriler gibi kendini antibiyotiklere karşı korumaktadırlar. Primer ilaçlara direnç geliştiği zaman etionamid, paraaminosalisilik asit, kapreomisin, kanamisin, sikloserin, amikasin, siprofloksasin, ofloksasin, rifabutin gibi sekonder ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.Ancak bu ilaçlarda hem maddi hemde toksisite açısından dezavantajlıdır.

Tüberküloz basili birçok ilaca doğal direnç göstermekte ve spontan mutasyonlarla direnç geliştirmektedir⁵⁹.

Duyarlılık testleri için kullanılan konsantrasyonlar bulunmaktadır. Bu konsantrasyonlardaki üreme sürecine göre direnç varlığı veya yokluğu tespit edilir(Tablo6).

Tablo5.*M.tuberculosis*’de ilaçlara direnç oluşturan genler ve mutasyon sıklığı

İlaç	Etki	Direnç	Mutasyon
	Mekanizması	Geni	Sıklığı(%)
RİF	Transkripsiyon inhibisyonu	<i>rpoB</i>	96-100
İNH	Mikolik asit sentezinin inhib.	<i>katG</i>	42-58
	DNA,lipid,karbonhidrat ve NAD	<i>inba</i>	21-34
	metabolizmasını etkiler	<i>kasA</i>	
		<i>ahpC</i>	10-15
PZA	Sitoplazmanın asidifikasyonu	<i>pncA</i>	72-97
EMB	Arabinogalaktan sentezinin inhib.	<i>embCAB</i>	52-59
STR	Protein sentezinin inhibisyonu	<i>rpsL</i>	8-21
		<i>rrs</i>	76

Tablo6.*M.tuberculosis*'in direnç ölçümünde kullanılan MGIT'ların son ilaç konsantrasyonları

İlaç	MGIT tüplerindeki son konsantrasyon
Streptomisin	1.0µg/ml
İsoniazid	0.1µg/ml
Rifampin	1.0µg/ml
Etambutol	5.0 µg/ml

2.7.4.1.1.Streptomisin

Streptomisin diğer aminoglikozid grubu antibiyotikler gibi S12 proteini ve 16SrRNA'ya etki ederek protein yapımını inhibe eder. Diğer bakterilerde aminoglikozidlere direnç asetilasyon ile ilacın inaktive edilmesi yoluyla olurken, *M.tuberculosis* türünde bu direnç şekline rastlanmamıştır. Streptomisine dirençli *M.tuberculosis* suşlarının %80'ninde iki tür mutasyon tespit edilmiştir: Ribozomal S12 proteinini kodlayan rpsL geninde oluşan nokta mutasyonu ve 16S rRNA'yı kodlayan rrs geninde oluşan mutasyondur. Ribozomlardaki bu değişiklikler ilacın bakteriye bağlanmasını azaltarak dirence katkıda bulunur⁶⁰.

2.7.4.1.2. İsoniazid

Nikotinamid'den sentezlenmiş olan isoniazidin etki mekanizmasının DNA ve RNA sentezini etkilediği yönündedir. Hızlı üreyen basillere etkilidir. Oral yolla alınır. 1-2 saatte maksimum serum düzeyine erişir. Butun vucut sıvılarına dağılır. Karaciğerden asetillenerek inaktive edilir. En sık gorulen yan etkisi hepatotoksisitedir. Alkol alımı ile toksik etkisi artar. SGOT ve SGPT değerlerinde artışa yol acar. İkinci onemli yan etkisi periferik noropatidir. Vitamin B6 ile antagonist etki gostermesi

sonucu bu yan etki oluşur ve günlük 10 mg piridoksin (vitamin B6) alımı ile ortadan kalkar⁶¹.

Yüksek düzey INH direnci (MİK >50µg/ml) olan klinik *M.tuberculosis* izolatlarında katalaz-peroksidaz aktivitesinde rol oynayan *katG* geninde *missense* mutasyonlar, küçük delesyonlar ve insersiyonlar tespit edilmektedir⁶².

2.7.4.1.3. Rifampisin

Streptomyces mediterranei'den elde edilen yarı sentetik bir ilactır. RNA sentezini bozarak etki gösterir. Devamlı ureyen ve persister basillere etkilidir. Oral yolla, ac karnına, tek doz olarak alınır. 2 saatte maksimum serum konsantrasyonuna ulaşır. Enterohepatik sıkluse girdiğinden etki süresi uzundur. Karaciğerde deasetilizasyona uğrar, vucut sıvılarını kırmızıya boyar. En önemli yan etkisi hepatotoksisitedir. Karaciğerde mikrozomal enzimleri indüklediğinden oral kontraseptifler, oral antikoagulanlar, digitoksin gibi ilaçlarla etkileşime girer⁶¹.

Rifampine dirençli *M.tuberculosis* kökenlerinin %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin beta altünitesini kodlayan *rpoB* genin 507-533. kodonları arasındaki 81 baz çifti (bç) uzunluğundaki “*rifampin resistance determining region (RRDR)*” veya “*hot spot*” adı verilen bölgede “*missense*” mutasyonların, küçük delesyon veya insersiyonların olduğu gösterilmiştir⁶².

2.7.4.1.4. Etambutol

Sentetik bir antibiyotiktir. DNA sentezini yavaşlatıcı etkisi vardır. Bakteriostatik etkilidir. Oral yoldan tek doz şeklinde alınır. Büyük çoğunluğu aktif şekilde böbrek yolu ile atılır. En önemli yan etkisi optik norittir. İlacın kesilmesi ile geriler⁶¹.

Etambutole direnç geliştiren *M.tuberculosis*'nin önemli bir bölümü EmbB proteininde meydana gelen aminoasit değişikliği sonucu EMB'ye direnç geliştirmiştir⁶².

2.7.4.1.5. Pirazinamid

Bir on ilactır, pirazin-2-karboksilik asidin amid turevidir, aktif bileşeni olan pirazinoik asidi serbestleştirmek için amid grubunun ayrılması gerekir. Etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Asit ortamda etkilidir. Yiyeceklerle emilimi

azaldığından yemekten yarım saat önce alınmalıdır. Yerine kullanılabilen **Morfozinamid** 'in dozu pirazinamid dozunun 1,5-2 katı olarak hesaplanır. Onemli yan etkileri hepatit, hiperurisemi, artralji, dokuntu, gastrointestinal rahatsızlıktır. Pirazinamidin kısa süreli rejimlerde dikkat ceken biryonu ilaca duyarlı TB de ilk iki aydan daha uzun süre verilmesinin ek bir yarar sağlamadığıdır⁶¹.

2.8. Tüberküloz Tedavisi

Günümüzde tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar, birinci seçenek(primer, major)ve ikinci seçenek (sekonder,minör) ilaçlar olarak iki gruptan oluşmaktadır.

2.8.1. Birinci Seçenek İlaçlar

Birinci seçenek ilaçlar içerisinde streptomisin(SM), izoniazid(INH), rifampisin(RIF), etambutol(EMB) ve pirazinamid(PZA) girmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde kullanılan thioasetazone(T)da bu grup içinde değerlendirilebilir .

Her bir ilacın farklı bir etkisi bulunduğu için kombine şeklinde alınmaları daha çok etkili olmaktadır. Herhangi bir direnç gelişmediği sürece bu ilaçların kullanımı devam etmelidir.

2.8.2. İkinci Seçenek İlaçlar

İkinci seçenek ilaçlar içerisinde para-amino salisilik asit (PAS), amikasin, ofloksasin, siprofloksasin, kanamisin,kapreomisin, etionamid, tiasetazon ve sikloserinden oluşmaktadır.Primer ilaçlara gelişen bir direnç söz konusu olduğunda sekonder ilaçlar kullanılırlar.Bu grup ilaçlar primer ilaçlara göre daha az etkili olmasının yanında daha toksik, daha pahalı ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır⁶³.

2.9.Epidemiyoloji

Son 10 yılda ölümlerin en önemli sebeplerinden olan tüberküloz DSÖ verilerine göre yılda 8.8 milyon yeni TB vakası görülmektedir.%80'den fazla vaka 15-49 yaş aralığındaki bireylerdir. Küresel bir salgın olduğu halde düşük sosyoekonominin olduğu ülkeler TB'den daha fazla etkilanmekte ve yaklaşık%98'i ölümle sonuçlanmaktadır. Tüberküloz ilaçlarının doğru kombinasyonları ve hasta tarafından düzenli kullanılması durumunda, hastalık genellikle tedavi edilebilmektedir. Dünyadaki TB olgularının

%85'ini Afrika ve Asya oluşturmaktadır. Hindistan ve Çin ise tüm olguların %35'ini oluşturmaktadır. Bu yüksek insidansın bölgede görülen HIV epidemisine bağlı olduğuna inanılmaktadır. Dünyanın her yerinde TB insidansı farklı boyutlardadır.(Şekil3)

Tüberkülozdan korunma ve etkin kontrol önlemlerinin geliştirilmesi ve yüksek ölüm oranlarından dolayı kökenler arasındaki benzerliğin araştırılması gereklidir. Mikobakterilerin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerinden yararlanılarak cins ve tür düzeyinde tanımlamaları yapılabilmektedir. Tür düzeyinde tanımlama tüberkülozun etiyolojisini aydınlatma bakımından yeterli olabilmektedir⁶⁴.

TB'nin tekrar dünyanın gündemine girmesinde etkili olan en önemli faktör çoklu ilaca dirençli suşların oranındaki artıştır. Çin'in Beijing bölgesinden orjin aldığı ve daha sonra tüm dünyaya yayıldığı tahmin edilen Beijing-W genotipinin çoklu ilaç direncine sahip olduğunun belirlenmesi epidemiyolojik çalışmaların bu yöne kaymasına neden olmuştur⁶⁵.

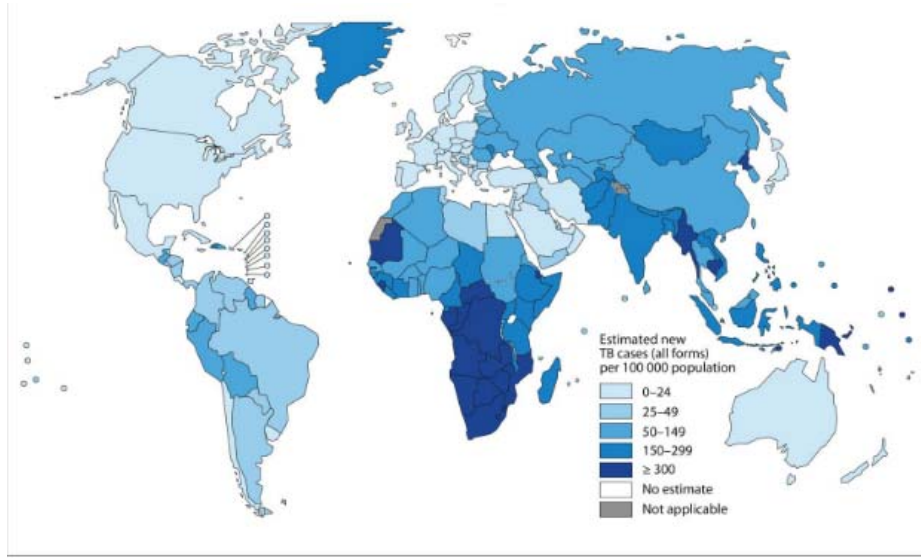
HIV enfeksiyonu ABD gibi gelişmiş ülkelerde tüberkülozun daha genç hastalarda rastlanması, reaktivasyona göre primer tüberküloz olgularının artması ve çoklu ilaca dirençli tüberküloz sayısında artış gibi tüberküloz epidemiyolojisinde önemli değişimlere neden olmuştur. Amerika ve Afrika'dan sonra Güney Doğu Asya ve Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde de bu iki hastalığın birlikteliği artış göstermiştir^{65,66,67}.

Dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ü yapılan PPD testi pozitifliği sonucu tüberküloz basili ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. 2015 yılına kadar hasta sayısının 50 milyona ulaşacağı, bunların üç milyonunun HIV enfeksiyonu ile birlikte olacağı ve 30 milyon insanın da bu nedenle ölmesi beklenmektedir¹⁶.

Dünyada 2011 yılında tahmin edilen tüberkülozlu hasta sayısı 8,7 milyondur. Ölen hasta sayısı 1,4 milyon olmakla birlikte 430 bini aynı zamanda HIV pozitifdir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2012 Küresel Tüberküloz Raporu'na göre Türkiye'de 2009 yılında 17 bin 388; 2010 yılında 16 bin 551 kayıtlı hasta bulunuyorken, 2011 yılında 15 bin 679 tüberküloz hastasının kayıtlarda yer aldığı bildirilmektedir. DSÖ, ülkelerdeki tüberkülozlu hasta sayısını tahmin ederken teknik bir terim olan "olgu bulma oranı"nı kullanmakta ve Türkiye için bu oran yüzde 85 olarak hesaplanmıştır. Başka bir ifadeyle DSÖ, 2011 yılında Türkiye'de var olan hastaların yüzde 15'inin kayıtlarda yer almadığını düşünmektedir. Akciğer tüberkülozlu hastaların yüzde 56'sının balgamında mikroskopla mikrop görülerek tanı konulmuş, tüberküloz hastalarının yüzde

8'i daha önce tedavi görmüş hastalardır. Bu oran yıllar içinde düşüyor. Kayıtlı hastalarda 2008 yılında yüzde 92, 2009 yılında yüzde 91 ve 2010 yılında yüzde 92 tedavi başarısı bulunmaktadır. Daha önce tedavi görmüş hastalarda tedavi başarısı yeni hastalara göre daha düşük olmakla birlikte, 2008 yılında yüzde 74, 2009 yılında yüzde 73 ve 2010 yılında yüzde 68 olarak bildirilmiştir¹⁷.



Şekil 3. 2011 yılında tahmin edilen TB insidansı¹⁷

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *M.tuberculosis* suşları

Haziran 2011-Mayıs 2011 yılları arasında Çukurova bölgesinde bulunan Adana, Mersin, Antakya, Osmaniye, Gaziantep, Kahramanmaraş, Şanlıurfa illerinde bulunan 17 Verem Savaşı Dispanserinden ve 1 Göğüs Hastalıkları Hastanesi ile 2 Devlet Hastanesi olmak üzere 3 yataklı hastaneden Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi-Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen, akciğer tüberkülozlu hastalara ait 22.619 örnekten, tüberküloz ön tanılı hastalara ait klinik örneklerden izole edilen 110 çoklu ilaç dirençli (MDR) *M. Tuberculosis* izolatu çalışmaya dahil edildi. İzolatlar, bölgemizde görülen *M. Tuberculosis* Kompleks dal ve alt dalları tespit edilerek türler arasında filogenetik ilişkilendirilebilmesi amacı ile IS6110, MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemlerinin kombinasyonu ile tiplendirildi.

3.2. Duyarlılık testleri

3.2.1. MGIT 960 Sistemleri ile antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi

3.2.1.1. Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması

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

3.2.1.2. Antibiyotikli ve antibiyotiksiz MGIT tüplerinin hazırlanması

Her test için 5 adet MGIT tüpünü alındı ve üzerleri yazıldı. (Kontrol-K, diğerlerine S, I, R ve E olarak). Her tüpe aseptik şartlarda 0,8 ml BACTEC MGIT 960 SIRE Supplement (Oleic acid, dextros, catalase, bovine albumin, polyoxethylene stearate) eklendi. Dört SIRE tüpünün her birine aseptik koşullar altında, firma önerileri doğrultusunda sulandırılmış liyofilize ilaç solüsyonlarından bir mikropipet yardımı 100 µL eklendi(Şekil4). Kontrol tüpüne antibiyotik eklenmedi.

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

Şekil.4.MGIT Tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları

3.2.1.3. İnokulum hazırlanması

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

3.2.1.4. İnokülasyon

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

3.2.1.5. Sonuçların yorumlanması

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

gözlenmeyen (400 GI) kontrol tüpleri ise bakteri yoğunluğu yetersiz olarak değerlendirildi ve antibiyogram yeniden yapıldı.

3.3. DNA Ekstraksiyonu

Spoligotyping, IS6110 ve MIRU-VNTR yöntemlerinde kullanılmak üzere seçilen 50 *M.tuberculosis* izolatının DNA' sının elde edilmesi için MGIT sıvı ve LJ katı besiyerinden Mickle cihazı kullanılarak ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrası spektrofotometre (CHEBIOS) ile DNA ölçümü yapılarak yeterli ve eşit miktarda DNA bulunduğu kontrol edildi. Her bir izolattan elde edilen DNA ekstraktına spoligotyping, IS6110 ve MIRU-VNTR metodları uygulandı. Ekstraksiyon protokolü aşağıda belirtildiği şekildedir.

3.3.1. Sıvı besiyerinden DNA Ekstraksiyonu

1. Üreme tespit edilen Middlebrook 7H9 besiyerinden 0.5ml mikrosantrifüj tüpüne alındı.
2. 80°C'de 30 dakika enkübe edilerek bakteriler inaktive edildi.
3. 15000xG'de 15 dakika çevrildi, üst sıvı atıldı.
4. 0.5ml 1xTE buffer ilave edildi.
5. 15000xG'de 15 dakika çevrildi, üst sıvı atıldı.
6. 0.25ml 1xTE buffer ilave edildi.
7. Tüpe 50-100µl cam boncuk (SIGMA acid washed glass beads) ilave edildi.
8. 2 dakika Mickle (Mickle tissue disintegrator) cihazında hücre parçalama işlemine tabi tutuldu.
9. 15000xG'de 10 dakika çevrilir, üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
10. -20 °C'de saklandı.

3.3.2. Koloniden DNA Ekstraksiyonu

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

3.4. IS6110-RFLP

IS6110-RFLP aşağıdaki protokol kullanılarak yapılmıştır (**van Embden *et al.*, 1993**).

3.4.1. Prop Hazırlanması ve İşaretlanması

Prop Hazırlanması

INS1 ve INS2 primerleri kullanılarak IS6110 fragmentinin 245 bp'lik PCR amplifikasyonu ile Prob hazırlanır (**Hermans *et al.*, 1990**).

Primer dizisi

INS-1 5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC

INS-2 5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA

Master mix (50µl) hazırlanması

Taq buffer	5.0 µl
dNTPs	4.0 µl
Primer1	0.5 µl
Primer 2	0.5 µl
Taq polymerase	0.46 µl
DNA (H37Rv)	2.0 µl
Distile su	37.54µl

245 bp'lik IS6110 fragmentinin PCR amplifikasyonu

1	Denatürasyon	96°C	1 dk.
2	Annealing	65°C	1 dk.
3	Uzama	72°C	2 dk.'da 35 siklus

Prob İşretlenmesi

1. Probe dioxigenin (DIG) labelling kit (Roche Applied Sciences, Germany) ile rastgele primer işaretleme metoduna göre dioxsigenin ile işaretlenir.

2. 10 µl DNA ile 5 µl Distile su karıştırılır.

3. Tüpler 10 dakika su banyosunda kaynatılır ve hemen buz üzerine alınıp 5 dakika bekletilir.

4. Tüplere buz üzerinde 2 µl DNA hexanücleotid karışımından, 2 µl dNTP karışımından ve 1 µl klenow enzimden eklenir. Son hacim 20 µl olacak şekilde distile su eklenerek hazırlanır. Karışım birkaç saniye santrifüj edilir ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edilir.

5. 1.5µl EDTA (0.5M) eklenerek reaksiyon durdurulur.

6. 2µl 3M CH₃COONa ve 3 volum soğuk alkol (75 µl) eklenerek prob çökeltilir. Reaksiyon karışımı -70°C' de 30 dakika inkübe edilir.

7. Reaksiyon karışımı 13000×g' de 15 dakika santrifüj edilir.

8. Supernatant kısmı alınır ve üzerine %70'lik ethanol (150 µl) eklenerek 13000×g' de 15 dakika santrifüj edilir.

9. Supernatant kısmı atılıp üzerine 50 µl TE buffer eklenir ve DIG işaretli prob süspanse edilerek hazırlanmış olur.

3.4.2. IS6110-RFLP Prosedürü

1. *M. tuberculosis* genomuna spesifik enzim olan *PvuII* restriksiyon enzimi ile DNA örnekleri kesilir.

5'-CAG/CTG-3'

3'-GTC/GAC-5'

- a. Eppendorf tüpe 5 µl DNA
 - b. 3 µl restriction buffer (10x) ve 2 µl *PvuII* enzim eklenir.
 - c. Toplam volum 30 µl olacak şekilde 20 µl distile su eklenir.
 - d. Tüp 30 saniye kadar santrifüj edilip 37°C' de 4 saat beklenir.
 - e. Reaksiyonu durdurmak için 6 µl dye xylene-cyanol içeren EDTA eklenir ve 68°C' de 10 dakika bekletilerek enzim inaktive edilir.
2. %1' lik agaroz jelde kesilen DNA örnekleri ile DIG işaretli DNA ladderlar 25 volt da 9 saat yürütülerek agaroz jel elektroforezi yapılır (1.2 volts/cm).
 3. DNA'ların agaroz jelden naylon membrana transferi 16 saat kadar sürmektedir. Transfer aşamaları:
 - a. Jel asidik buffer (0.25 M HCl) ile 15 dk çalkalayarak muamele edilir ve 2 kez distile su ile yıkanır.
 - b. Jel alkali buffer (0,5 M NaOH/ 1.5 M NaCl) ile 15 dk çalkalayarak muamele edilir ve 2 kez distile su ile yıkanır
 - c. Jel nötr buffer (3 M NaCl / 0.5 M Tris-HCl) ile 15 dk çalkalanarak muamele edilir.
 - d. Aparatların tamamı hazırlanır:
 - i. 15 × 20 cm² cam plaklar cam tepsi üzerine yerleştirilir.

- ii. Whatman filtre kağıtları 20 X SSC 'de nemlendirilip cam plak üzerine yerleştirilir.
 - iii. Jel whatman filtre kağıdı üzerine yerleştirilir
 - iv. Jelin üzerine naylon membran yerleştirilir.
 - v. Membran üzerine 3 veya 4 adet 6XSSC' de nemlendirilmiş whatman filtre kağıtları yerleştirilip bunların üzerine kuru filtre kağıtları yerleştirilir.
 - vi. Membran ve filtre kağıtları üzerine 500 gr' lık ağırlık konur.
 - vii. Hazırlanan düzenek oda ısısında bir gece bekletilir.
4. Jel kurutularak atılır ve naylon membran 6x SSC ile muamele edilir.
 5. 6 x SSC ile 2dk muamele edilen membran hibridizasyon fırınında 120°C' de 30 (80-1 saat) dakika fiske edilir.
 6. Fırından sonra tekrar 6 x SSC ile 2 dakika muamele edilip filtre kağıtları ile kurulanır.
 7. Naylon membran 15 ml hibridizasyon sıvısı ve 100 µl tRNA eklenerek polietilen poşette paketlenir.
 8. Su banyosunda 42°C' de 2 saat çalkalayarak inkübe edilir.
 9. Polietilen poşetten çıkarılarak tekrar hibridizasyon sıvısına atılıp 2 saat bekletilir.
 10. Polietilen poşete 15ml hibridizasyon sıvısı ile 6 µl DIG işaretli prob eklenip su banyosunda 42°C çalkalanarak gece boyunca inkübe edilir.
 11. Membran polietilen poşetten çıkarılıp ve farklı SSC konsantrasyonlarında yıkanır:

- a. Membran 4 x SSC ile 42°C' de 15 dakika su banyosunda çalkalanarak yıkanır ve sıvı uzaklaştırılır.
 - b. Membran 2 x SSC ile 42°C' de 15 dakika su banyosunda çalkalanarak yıkanır ve sıvı uzaklaştırılır.
 - c. Membran 1 x SSC ile 42°C' de 15 dakika su banyosunda çalkalanarak yıkanır ve sıvı uzaklaştırılır.
 - d. Membran 0.5 x SSC ile 42°C' de 15 dakika su banyosunda çalkalanarak yıkanır ve sıvı uzaklaştırılır.
- 12.** Membran cam tepsi içine alınıp üzerine 15 ml DIG buffer No.1 eklenip 2 dakika inkübe edilir.
- 13.** Membrandan sıvı uzaklaştırılır.
- 14.** Cam tepsi içindeki membrana blocking reageni içeren DIG buffer No. 2 eklenerek oda ısısında 30 dakika inkübe edilir.
- 15.** Membrandan sıvı uzaklaştırılır.
- 16.** Polietilen poşet içinde membrana 30 ml DIG buffer No.2 ile 6 µl anti-DIG alkalın fosfataz (1: 1500) eklenip su banyosunda çalkalanarak 37°C 30 dakika inkübe edilir.
- 17.** Membrandan sıvı uzaklaştırılır.
- 18.** Membran 15'er dakika DIG buffer No.1 ile 2 kez yıkanır.
- 19.** Membrana 20 ml DIG buffer No.3 eklenip 2 dakika inkübe edilir ve sıvı uzaklaştırılır.
- 20.** Membran polietilen poşet içinde 20 ml DIG buffer No. 3 ile 250 µl BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine Salt) ve Nitro-Blue Tetrazolium Chloride (NBT) substrat eklenip karanlıkta 37°C' de 30 dakika inkübe edilir.
- 21.** Işıktaki birkaç dakika bekledikten sonra görüntü alınır.
- 22.** Membranda bantlar görünmüyorsa substrat solüsyonu içinde 37°C' de bir gece karanlıkta inkübe edilir.
- 23.** Sonlandırma reaksiyonu olarak da 10 ml buffer No. 1 ile muamele edilir.

3.4.3. IS6110-RFLP Metodunda Kullanılacak Çözeltiler

1. Gel Elektroforezi için gerekli çözeltiler

T.B.E Buffer (pH 8.0)

Stok konsantrasyon 1000 ml 10xTBE

Tris	:	108 gm
Boric acid	:	55 gm
0.5 M EDTA	:	40 ml
Distilled water	:	700 ml

Son volum distile su ile 1000 ml' ye tamamlanır.

% 1 Agaroz gel

Agarose	:	1 gm
10x T.B.E	:	10 ml
Distilled water	:	90 ml
Ethidium Bromide	:	5 µl

Ethidium Bromide

Stok konsantrasyon	:	1 mg/ml
Çalışma konsantrasyonu	:	0.03 mg/ml

Loading

Stok konsantrasyon	:	6 x
Çalışma konsantrasyonu	:	1 x

Xylene cyanol	0.25%
Bromophenol blue	0.25%
Glycerol	30%

Total volum distile su ile 10 ml' ye tamamlanır.

2. Southern blot için gerekli çözeltiler

Asidik buffer

HCL (conc.)	: 12.5 ml
Distilled water	: 487.5 ml

Alkali buffer

NaOH (0.5M)	: 10 gm
NaCl	: 43.84 gm
Distilled water	: 500 ml

Nötr buffer

NaCl (5M)	: 87.75 gm
1M Tris HCL (0.05M, pH 7.0)	: 250 ml

Total volum distile su ile 500 ml' ye tamamlanır

20x SSC buffer (Saline sodium citrate buffer) pH-7.0

3M NaCl	: 175.3gm/l
0.3M sodium citrate	: 88.2 gm/l

Total volum distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

3. Hibridizasyon için kullanılan çözeltiler

Hibridizasyon sıvısı

Ficoll 400	: 0.5 gm
Bovine serum albumin (BSA)	: 0.5 gm
Polyvinyl pyrrolidone (PVP)	: 0.5 gm
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	: 2.5 gm
20x SSC	: 125 ml

1M tris HCL (pH7.5) : 25 ml

0.5M EDTA : 1 ml

Deionized formamide : 250 ml

Total volum distile su ile 500 ml' ye tamamlanır.

4.Probe işaretleme reagenleri

Tablo 7. DIG random primed DNA işaretleme kiti (Roche diagnostics, Germany)

S. No.	Reagenler	İçindekiler
1.	Hexanucleotide	290 units 1ml mixture (10x) random hexanucleotides, 500mM MgCl ₂ , 1mM DTE (Dithiothreitol), 2mg BSA (pH 7.2)
2.	dNTP labeling	1mM dATP, 1mM dCTP mixture (10x 1mM dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 M DIG-11-dUTP (pH 7.5)
3.	Klenow enzyme	2 units\ml DNA polymerase (Klenow enzyme) labeling grade, from E.coli.

5. Hibridizasyon yıkama çözeltileri

a) 4x SSC buffer

20 ml 20x SSC + 80 ml distile su + 0.1 gm SDS

b) 2x SSC buffer

10 ml 20x SSC + 80 ml distile su + 0.1 gm SDS

c) 1xSSC buffer

5ml ml 20x SSC + 80 ml distile su+ 0.1 gm SDS

d) 0.5xSSC buffer

2.5 ml 20x SSC + 80 ml distile su + 0.1 gm SDS.

6. IS6110-RFLP çözeltileri

a) DIG Buffer No. 1 (pH-7.5)

0.15M NaCl	: 8.77 gm
0.1 M Maleic acid	: 11.607 gm
Distilled water	: 1000 ml

b) DIG Buffer No. 2 (10%)

DIG blocking powder	: 10gm
DIG buffer no.1	: 100ml

c) DIG Buffer No. 3

1M Tris HCl (pH 9.5)	: 10 ml
5M NaCl	: 2 ml
1M MgCl ₂	: 5 ml
Distilled water	: 83 ml

3.5. Spoligotyping

Seçilen 467 *M.tuberculosis* izolatına ekstraksiyon sonrasında spoligotyping metodu uygulandı. Spoligotyping metodunun PCR aşamasında 36 bp uzunluğunda DR bölgelerinin amplifikasyonu gerçekleştirildi.

3.5.1. PCR

DRa: 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3' (5'-ucundan biotin ile işaretli)

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

DR bölgesini hedef alan primer sentezletildi. Çalışmanın her defasında pozitif (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG veya genotipi bilinen klinik izolat) ve negatif kontrol (dH2O) kullanıldı. Her bir suş için aşağıdaki miktardaki reaksiyon karışımı hazırlandı.

9.5ml dH2O

12.5ml 2x PCR Master Mix (Fermantas)

0.25ml DRa (25pmol/ml)

0.25ml DRb (25pmol/ml)

2.50ml Kalıp DNA

PCR reaksiyon karışımı içeren tüpler Termal Cycler Cihazına (Applied Biosystem AB) yerleştirilerek aşağıdaki programda çalıştırıldı;

95°C 5 dak.

94°C 1 dak.

55°C 1 dak. 40 siklus

72°C 45 sn.

72 °C 10 dak.

4 °C μ

PCR reaksiyon karışımı mikobakteri DNA'sı içermeyen temiz bir odada hazırlandı. DRa primeri biotinle işaretli olduğundan dolayı +4°C'de saklandı. DRb primeri küçük miktarlara bölünerek -200C'de saklandı.

3.5.2. SpoligotypingMetodunda Kullanılacak Çözeltiler

Spoligotyping metodunda kullanılacak çözeltiler laboratuvarımızda aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

0.5M EDTA (pH 8,0)

EDTA 46,53g

dH₂O 250ml

pH 8,0'e ayarlandı ve otoklavlandı.

20mM EDTA (pH 8,0)

dH₂O 960ml

0.5M EDTA 40ml

20x SSPE (pH 7,4)

0,2M Na₂HPO₄ 28,39gr/L

3,6M NaCl 210,24gr/L

dH₂O 960ml

0,5M EDTA 40ml (Otoklavlanır)

2xSSPE

20 × SSPE 100ml

dH₂O 900ml

%10 SDS

Önceden ısıtılmış(60°C) dH₂O 250ml

SDS 25gr

2xSSPE / %0.1SDS

dH₂O 890ml

20 × SSPE 100ml

% 10 SDS 10ml

SSPE solüsyonu ve SDS solüsyonu ayrı mezurlarda ölçüldü.

2xSSPE / %0.5SDS solüsyonu

dH₂O 850ml

20 × SSPE 100ml

% 10 SDS 50ml

%1 SDS

% 10 SDS 100ml

dH₂O 900ml

10 × TE

Tris HCl 15,764g (100mM)

0,5M EDTA 20ml (10mM)

dH₂O 980ml

3.5.3. PCR Ürününün Hibridizasyonu ve Görünür Hale Getirilmesi

Biotin işaretli primerler kullanılarak ve DR bölgesi hedef alınarak gerçekleştirilen PCR sonrası ampikonların hibridizasyonu gerçekleştirildi. Hibridizasyon ve hibridizasyon sonrası ürünlerin streptavidin alkalin fosfataz enzimi ve fosfatlı kemifloresan substratı eklenerek görünür hale getirilme prosedürü aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

1) Bütün tampon çözeltileri önceden çalışılmak istenen ısıya getirildi.

Bir membran için gereken miktarlar;

80ml 2xSSPE / % 0,1 SDS, 60°C

160ml 2xSSPE / % 0,5 SDS, 60°C

160ml 2xSSPE / % 0,5 SDS, 42°C

160ml 2xSSPE, oda sıcaklığı

2) 150ml 2xSSPE / % 0,1 SDS üzerine 20ml PCR ürünü ilave edildi.

3) PCR ürünlerini 99°C 10 dakika boyunca denatüre edildi.

4) PCR ürünleri denatüre edilirken, membran (ISOGEN) 80ml 2xSSPE / % 0,1 SDS ile 60°C 5 dakika yıkandı.

- 5) Sünger yastığı (İmmunetiks Plastic Cushion PC200) ve membranı miniblotter'a (Miniblotter- 3024) yerleştirirken, miniblotter'ın slotlarının membrana çizgi şeklinde bağlanmış oligonukleotidlere dikey konumda olmasına dikkat edildi.
- 6) Slotlarda kalan residüel sıvı aspirasyonla uzaklaştırıldı.
- 7) Slotlar dilüe edilmiş sıcak PCR ürünü ile dolduruldu. Miniblotter horizontal konumda 60°C'de 60 dakika hibridize (FİNEPCR- combi-SV120) edildi.
- 8) Örnekler slotlardan aspire edildi ve plastik penset kullanarak membran miniblotter'dan çıkarıldı.
- 9) Membran iki kez 80ml 2xSSPE / % 0,5 SDS ile 60°C'de 10 dakika yıkandı.
- 10) Membran bir poşet dosya içine koyuldu.
- 11) 5ml 2xSSPE / % 0,5 SDS üzerine 1,25ml streptavidin-alkalen fosfataz konjugatı (500U/ml) (Promega) ilave edildi, karışım üç tarafı kapatılmış poşet dosya içindeki membrana döküldü, hava kabarcıkları uzaklaştırılarak, poşet dosyanın açık kenarı ısıtılarak kapatıldı. 45-60 dakika boyunca 42°C'de enkübe edildi.
- 12) Membran iki kez 80ml 2xSSPE / % 0,5 SDS ile 10 dak 42°C'de enkübe edildi, 80 ml 2xSSPE ile 5 dakika oda sıcaklığında durulandı.
- 14) Membran üzerine 5ml ECF substratı (Attaphos AP Flourescent Substrate, Promega) ilave edildi, poşet dosya içinde 60 dakika boyunca enkübe edildi.
- 15) Membran stretch film ile sarılarak uygun illuminasyon kasetinde (450nm) 20 saniye expose edilerek (QUANTUM-ST4 3020-WL/BLUE/20M) görüntü alındı.

3.5.4. Membranın Görüntülenmesi ve Yorumlanması

Spoligotyping metodu sonuçların yorumlanması aşamasında spacer oligonukleotidlerin kovalent bağlandığı membranla PCR ürünü hibridizasyonu sonucu, oluşan blotlanmalar dikkate alınarak spacer bölgelerinin varlığı değerlendirildi. Sonuçlar tablo 3'de belirtilen Oktal kodlama anahtarı kullanılarak 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan "Oktal kod" formatına çevrildi. Elde edilen veriler SpolDB4 veritabanı kullanılarak kümeler ve familyalar (clade) belirlendi. Database adres:

<http://www.pasteurguadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/outilsConsultation.jsp>

Spoligotyping sonuçlarının değerlendirilmesinde kullandığımız Oktal kod anahtarı

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

3.5.5. Membranın Regenerasyonu

Membranın hibridizasyon ve görüntüleme sonrasında tekrar kullanılabilmesi için aşağıdaki yıkama ve regenerasyon aşamaları uygulandı.

1) Membran iki kez % 1 SDS ile 80°C’de 30 dakika enkübe edildi.

2) Membran 20mM EDTA pH 8 ile 15 dakika oda sıcaklığında enkübe edildi.

3) Membran 20mM EDTA pH 8 içinde poşet dosya içinde, kullanım sayısı ve tarih yazılarak +4°C’de saklandı.

3.6. MIRU-VNTR

Bu çalışmada 15 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanıldı. Hedeflenen MIRU lokusları için literatürde belirtilen primerler sentezlendi.

3.6.1.PCR

Her bir suşa özgü 15MIRU lokusunun VNTR sayısının belirlenmesi için 15 PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

PCR için reaksiyon karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

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

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

94° C 5dak.
95° C 30 sn.
62° C 60 sn. 40 siklus
72° C 90 sn.
72°C 10 dak.
+4 °C ∞

3.6.2. PCR Ürününün Agaroz Jele Yüklenmesi, Elektroforezi ve Yorumlanması

Amplikonlar 150 Voltta, 180 dakika, etidyum bromürlü % 2 lik agaroz (SIGMA) jel elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonrası jel görüntüleme sistemi (QUANTUM-ST4 3020-WL/BLUE/20M) ile görüntülendi. Bant büyüklüğünün tespitinde 50-1000 bp lik marker (Fermantas) kullanıldı. Bant büyüklüklerine dayanarak 15 lokus MIRU-VNTR tiplleme sonucunda her bir MIRU lokusunda bulunan allel tekrar sayıları miruvntrplus veritabanı kullanılarak değerlendirildi. (www.miruvntrplus.org)

4.BULGULAR

Spoligotipleme, MIRU_VNTR ve IS6110 genotipleme yöntemlerinin *M. tuberculosis* identifikasyonu ve sürveyansındaki önemi ile Adana Bölge Tüberküloz laboratuvarına; Adana, Mersin, Osmaniye, Hatay, Gaziantep ve Kilis illerindeki 3'ü yataklı tedavi kurumu ve 18'ide VSD olmak üzere toplam 21 merkezden Haziran-2011-Mayıs 2013 tarihleri arasında Tüberküloz ön tanılı veya şüpheli temas öyküsü olan 22.619 balgam örneğinden izole edilen *M. tuberculosis* suşlarının klonal ilişkisini belirlemek amacı ile planlanan çalışmada; değerlendirmeye alınan örneklerin Adana ilinde yoğunlaştığı görülmüştür(Tablo8).

Tablo8. Değerlendirmeye alınan balgam örneklerinin merkezlere dağılımı

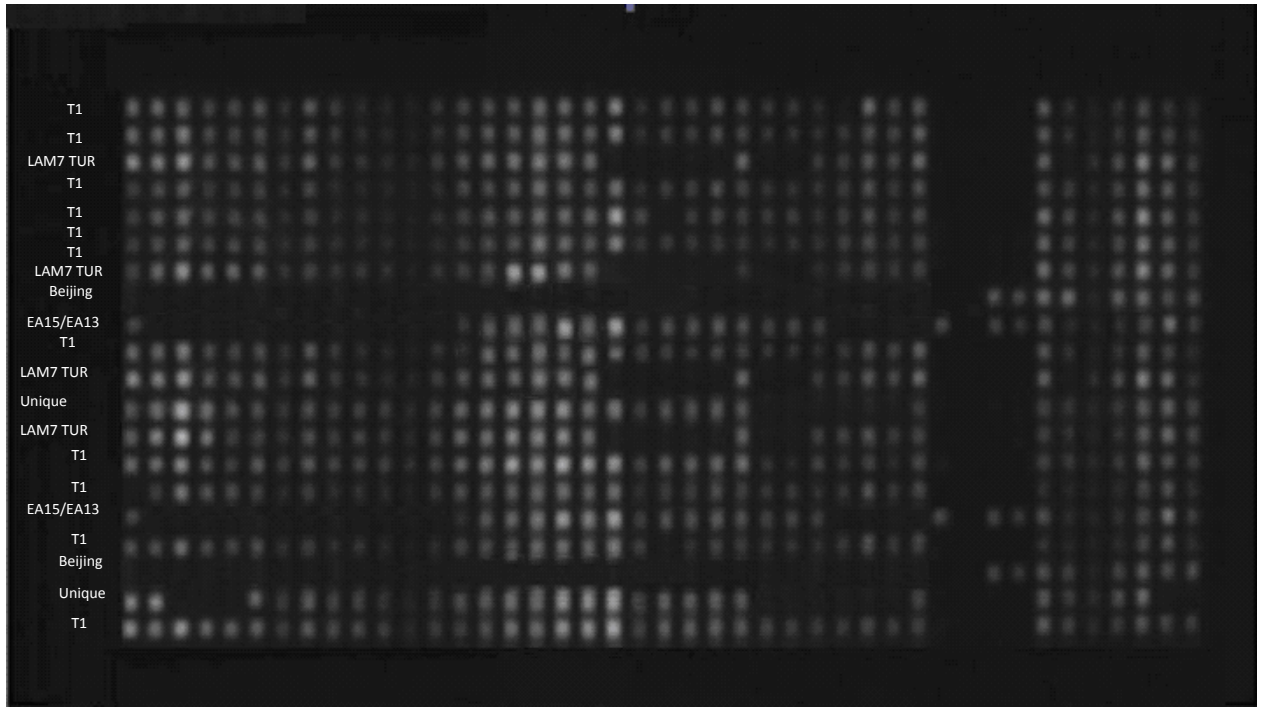
Merkez	Adana	Mersin	Kahramanmaraş	Hatay	G.ante
Sayı	5183	3819	2262	3110	4524
%	22.9	16.9	10.0	13.7	20.0

Her hastadan ardışık olarak 3 gün alınan örneklerden *M tuberculosis* izole edilen bir balgam örneği dikkate alınmış, ancak aynı hastaya ait en az 3 ay ara ile pozitiflik tespit edilen her balgam örneği farklı suş sayılarak çalışmada değerlendirilmiştir. Böylece hastaya ait örnek/örneklerde 110 MDR *M tuberculosis* izole edilmiştir. Bu bağlamda en yüksek oranda MDR izolatu Adana ilinden balgam örnekleri gönderilen hastalara ait olduğu görülmüş (Tablo9).

Tablo9. M tuberculosis ilaç direnci MDR tespit edilen hastaların illere dağılımı

Merkez	Adana	Mersin	Kahramanmaraş	Hatay	Gaziantep
Sayı	56	16	2	20	16
%	50,9	14,6	1,8	18,1	14,6

Çalışmaya dahil edilen toplam 110 izolatın Spoligotyping metodu ile genotiplendirilmesi sonucunda suşların; 107'sünün (%98,5) 18 küme içerisinde yoğunlaştığı görülmüş, 1 izolatın X1 genotipine ait olduğu, 3 suşun ise (% 2,07) ise SpolDB4 veri bankasındaki yer alan suşlardan hiç birisine uymadığı yani tek kümeli tanımlanmamış suşlar oldukları görülmüştür. Spoligotiplemede en büyük kümenin 53 izolat (% 48,02) ile T1 kümesi olduğu, bunu 11 (%10) izolat ile EAI5/EAI3 ailesinin ve 9 izolat ile (% 8,2) LAM7 TUR ailesinin izlediği bu süre içerisinde sadece 2 (%1,8) suşun Beijing ailesine ait olduğu görüldü(Şekil5-Tablo10).



Şekil5.Spoligotyping ile elde edilen genotip profilleri

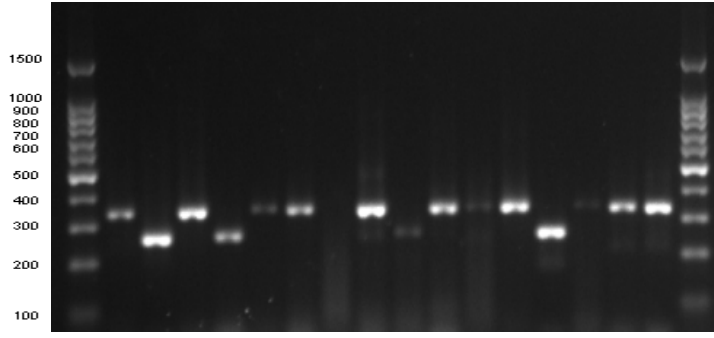
Bu çalışmada tanımlanan iki Beijing tipinin Adana bölgesindeki merkezlerde izlenen hastalara ait olduğu görülmüş olup bu Adana bölgesi için ilk tanımlanmış yerli Beijing suşlarıdır.

Tablo10. M.Tuberculosis izolatlarının spoligotyping ile genotiplere dağılımı.

Spoligotyping Aile	Suş Sayısı	Görölme sıklığı(%)
T1	53	48,2
LAM7 TUR	9	8,2
EA15/EA13	11	10
MANU1	7	6,4
T3	5	4,6
EA15	4	3,6
LAM9	3	2,7
H1	5	4,6
T2	3	2,7
CAS1-Delhi	1	0,9
LAM3	1	0,9
Beijing	2	1,8
X1	1	0,9
Bovis	2	1,8
Unique	3	2,7

Değerlendirmeye aldığımız 110 izolat içerisinde T1 suşlarının %48,2 oranı ile en sık karşılaşılan aileyi oluşturdukları ve SpolDB4 database de bu ailenin 3 alt tipinin olduğu görülmüştür.

15 lokus MIRU-VNTR ile yaptığımız klonal tiplerde suşların hiç birisinin aynı klona ait olmadıkları, yani ortak MIRU-VNTR kalıbına sahip suşların bulunmadığı görüldü. T1 suşlarında en belirgin ortak lokusun suşların tamamında ortak olan ilk üç lokustaki 223 tekrarlarının olduğu, 12 ve 13. Lokuslardaki 33 tekrarının ise suşların %98’inde görüldüğü tespit edildi(Şekil6).



Şekil6.MIRU-VNTR jel görüntüsü

5.TARTIŞMA

M.tuberculosis kompleksi içerisinde yer alan aside dirençli mikroorganizmaların sebep olduğu tüberküloz özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan, tüberküloz kontrol programlarının uygulanmadığı veya uygulanmadığı ülkelerde yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmekte, genel olarak tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen özellikle genç yetişkinlerde ölümün en önemli sebepleri arasındaki yerini korumaktadır. Tüberkülozdan korunma ve global tehdit haline gelen salgının önlenmesinde erken ve yüksek duyarlılıkta tanı yöntemlerinin geliştirilmesi kadar, mikroorganizmanın toplumdaki hareketini izleyecek, klonal düzeyde tanıya imkan veren tiplendirme yöntemlerine ve bu yöntemler kullanılarak yapılacak epidemiyolojik sürveyansa ihtiyaç vardır. Ancak DSÖ aktif tüberkülozlu hastaların % 86'sının gelişmekte olan ülkelerde yaşamakta olduğunu tüberkülozdan ölümlerin % 95'inin de yine bu ülkelerde görüldüğünü bildirmektedir ki bu ülkelerde epidemiyolojik sürveyansı baz alan iyi çalışan kontrol programlarının uygulanmadığının da altını çizmektedir. Çoğu Afrika ve Güney Doğu Asya'da yer alan gelişmekte olan bu 22 ülkede yaşayan hastaların ancak yarısından azı tanı alabilmekte, tanı alanların da yarısından azı tedavi edilebilmektedir. Ayrıca, gelişmiş ülkelerde enfekte bireylerin % 80'i 50 yaş ve üzerindeki yaş grubunda yer alırken, gelişmekte olan ülkelerdeki hastaların %77'si en üretken yaş grubu olan 15-50 yaş grubunda bulunmaları bu ülkelerde zaten yetersiz olan üretim kaynaklarını sıkıntıya sokmaktadır¹⁷. Son 30 yıl içinde sosyoekonomik sorunlar, göçler, tüberküloz kontrol programlarının ihmal edilmesi bölgesel savaşlar veya iç karışıklıklar sebebi ile yaşanan kitlesel göçler ve özellikle de HIV/AIDS salgınının ortaya çıkmasıyla gelişmiş birçok ülkede tüberküloz insidansında artış olmuştur. Kötü kontrol programları sonucunda ilaç direnci yaygınlaşmış ve bazı bölgelerde ortaya çıkan çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis* Beijing ailesi gibi bazı genotipler, bölgeleri dışına taşınmış ve tüm dünyada halk sağlığı için önemli bir tehdit niteliği kazanmıştır⁵⁷.

Bu global tehdit tüm dünyada Tüberküloz kontrol programlarının yeniden önem kazanmasına yol açmıştır. Bu programlar tanıda duyarlılığın arttırılması tedavinin sağlık personeli gözetiminde tamamlanması ve MTK suşlarının ülkeler ve bölgeler arası hareketlerinin izlenmesini hedef alır. MTK suşların izlenmesinde fenotipik karakterlere dayalı ayırımın yerini genotipik özelliklere dayalı spoligotipleme ve MIRU-VNTR gibi

moleküler bazlı yöntemler almıştır³⁶. Bu yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda iyi kontrol programı uygulanan ülkelerde sıklıkla MDR olan ve XDR suşların ortaya çıkışı için en büyük potansiyel tehdit sayılan Beijing suşlarının oldukça düşük oranlarda görüldüğü bildirilmiştir⁶⁸. *M. tuberculosis* için riskli ülkelerin yer aldığı Afrika boynuzu ülkelerinden Kampala Uganda’da, Asiimwe BB. ve arkadaşlarının (2008) 18 yaş ve üzeri hastalardan izole edilen 344 suşu spoligotyping metodu tiplendirdikleri çalışmalarında, izolatların 33 spoligo kümesi içerisinde yoğunlaştıklarını, 57 izolatında özel spoligotyping paterni verdiklerini tespit etmişlerdir. Bu grup en sık görülen ailelerin, % 70 oranında (241 suş) T2, % 3,5 oranında CAS1-Kili, % 2,6 oranında LAM9 ve % 2,6 oranında CAS1-Delhi aileleri olduğunu bildirmişler. % 1,2 (4 suş) oranında Beijing genotipi bildirilen bu çalışmada suşların % 26,7 sinin HIV seropozitif hastalardan izole edildiği, % 8,1’inin INH ve % 4,4’ünün de RIF dirençli olduğunu bildirilmiştir⁶⁹. Öte yandan Lari N. ve arkadaşlarının 2005 yılında İtalya-Tuscany de yatan hastalardan 1 yıl boyunca topladıkları 248 MTK izolatını Spoligotyping metodu ile değerlendirdikleri çalışmalarında, 116 izolatın tek üyeli özel küme ve 12 izolatın tanımlanamayan izolatlar olduklarını, 166 izolatın ise 34 küme (% 67) oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu grup T1 ailesini % 11,6 oranı, H3 ailesini % 7,2 ve LA9 ailesini % 5,2 oranları ile Tuscany de en baskın görülen 3 spoligotyping ailesi olarak tanımlamışlar, Beijing ailesine ait 7 (% 2,8) suş tespit etmişlerdir⁷⁰. Molina-Torres ve arkadaşlarının 2010 yılında Monterrey Meksika’da yaptıkları çalışmada, Monterrey’in kırsal bölgelerinden toplanan 180 *M. tuberculosis* izolatını Spoligotyping metodu ile genotiplendirmişlerdir. Bu grup sonuç olarak 176 izolatın 44 spoligo international tipe ait olduğunu 4 izolatın ise SpolDB4 te karşılığı olmayan orphan tipler olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca en sık görülen gen ailesinin 43 (% 23,8) suş ile T1, ikinci sıklıkta görülen aileninde ise 28 (% 15,5) suş ile X1 ailesi olduğunu bildirmişlerdir⁷¹.

Bölgemizde Zeytinli Ü ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada değerlendirdikleri 467 MTK suşundan 24’ü (% 5,1) orphan suş olarak tanımlamışlar, kalan 443 izolatın üye sayısı 2-215 arasında değişen 21 küme içerisine dağıldığını bildirmişlerdir. Bu grup izolatlarının kümeleşme oranının % 94,9 olduğunu bildirmişlerdir. Yine MIRU-VNTR metodunun Spoligotyping metodu ile kombinasyonu sonucunda 443 izolat içeren 21 kümeni, alt kümelere bölündüğünü belirterek en fazla suş içeren T1 (n= 239) ailesi 12 lokus MIRU-VNTR metodu ile kombinasyonu sonucunda 21 tek üyeli özel küme profili

görmüşlerdir¹⁴. Biz çalışmamızda 110 MDR *M. tuberculosis* suşu irdeledik. Bizim MTK içerisinde yer alan suşlarımızın tamamının spoligotyping ile 19 küme içerisine dağıldıklarını ve en büyük kümeyi daha önce bölgemiz suşlarının da en büyük kümeyi oluşturduğu Zeytinli ve arkadaşları tarafından bildirilen T1 kümesinde yoğunlaştıkları görüldü. Bizim diğer izolatlarımızın dağılımı da bu grubun bölgemizde yaptığı çalışmada elde ettikleri bulgulara büyük ölçüde benzerlik göstermiştir. Bizim çalışmamızda bölgemiz açısından en önemli bulgu, daha önce yapılan çalışmada 6 izolat ile varlığı gösterilen Beijing suşlarının, bizde 2 izolat ile oransal anlamda düşüklük göstermesi ve çalışmada izole edilen bu suşların tamamının Adana bölgesi suşları olmasıdır. Daha önceki çalışmada elde edilen 6 Beijing suşunun tamamının Urfa kökenli olduğu vurgulanmıştır. Bu sonuçlar bölgemizde MTK içerisinde yer alan türlerin çok düşük oranlarda farklılıklar göstermekle birlikte büyük ölçüde değişmediğini, Beijing suşunda bölgeye yerleşmeye başladığını göstermiştir. Yine biz çalışmamızda MIRU-VNTR ile aynı lokus profiline sahip suşa rastlamadık. Bu reenfeksiyona sahip hasta bulunmadığını ve bir klondan yayılımın bölgemiz için söz konusu olmadığını gösteren değerli bir bulgudur. Chang L. ve arkadaşlarının 2010 yılında Kore’de yapılan çalışmada genotipik dağılımın Dünya çapında birkaç ülkeye ait olduğu bulunmuş ve toplamda 96 örnek çalışılmıştır. Spoligotipleme ile IS6110 kombine çalışıldığında 19 farklı pattern oluşurken 24 küme oluşturmuşlardır⁷². Kremer K.(2005) ve ark.’nın yaptıkları çalışmada 526 *M.tuberculosis* izolatlarının 253 IS6110 farklı patterni gösterilirken, 148 Beijing suşunun 106’sı IS6110-RFLP ile tanımlanabilmiş ve 46 küme oluşturduğu bulunmuştur⁷³. Aggarwal (2007) ve ark.’nın Hindistan’da yaptıkları çalışmada IS6110 kopya sayısına göre dört grupta sınıflandırılmış en fazla % 56 oranında yüksek kopyalı (6-19) suşlar, bulunmuş ve 19 kopya sayısından fazla kopyası olan suşlarda bulunmasına rağmen değerlendirmeye alınmamıştır⁷⁴. Yine 2008 yılında Hindistan’da Jitendra PM ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 83 izolat spoligotipleme ve IS6110-RFLP yöntemleri ile kombine çalışılmıştır. 40 izolat IS6110 ile benzersiz bulunmuşken spoligotipleme ile kullanıldığında 83 izolat 47 kümeden oluşmuştur⁷⁵. Martilla(2010) ve arkadaşlarının Fillandiya’da yapılan çalışmasında 1995-2004 yılları arasında toplanan 3959 örnek kullanılmıştır. 183 dirençli suşun 181 tanesinin IS6110-RFLP ile ayrımı yapılabilmektedir. Düşük kopya sayılı örneklerde spoligotipleme ile analiz edildiğinde 17 küme

oluřturulmuřtur⁷⁶. Japonya’da 2009 yılında Ohkado A. ve ark’nın çalışmasında streptomisin dirençli suşlar seçilmiştir. İzolatlar MIRU-VNTR ve IS6110-RFLP yöntemleri ile çalışmıştır. Streptomisin dirençli suşlarının IS6110-RFLP bant patternleri 2 suş hariç diğeri izolatlar 14 kopyalı bulunmuřtur⁷⁷. Watson(2009) ve ark’nın çalışmasında 1998 yılına ait 2265 izolat kullanılmıştır. İzolatlardan 1808’nin IS6110 kopya sayısı 5’den büyük bulunmuştur. Ayrıca 152 küme oluşturulmuştur. Sonuçtaki bant benzerliklerine göre hastaların %14’nün Hindistan kökenli olduğu bulunmuřtur⁷⁸. Biz alışmamızda suşlarımızın 17 küme 24 farklı kalıpiersinde dağıldıklarını gördük. Küme dağılımları MIRU-VNTR küme dağılımları ile büyük ölçüde benzerlik gösterdiğini ancak spolgotipleme ile uyumsuz olduğunu gördük. IS6110 genotipleme tek başına veya diğeri iki yöntemle koopere edilmesi zor sonuçlar ürettiğı ve uygulama güçlüğü sebebi ile MIRU-VNTR + spoligotyping kombinasyonunun moleküler epidemiyolojik izlemde ideal olduğu kannatine vardık.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bölge genelinde *M.tuberculosis* suşlarının klonal ilişkileri ve hareketini Spoligotyping, MIRU-VNTR ve IS6110 RFLP yöntemleri kullanarak belirlemek amacı ile planlanan çalışmada;

1- Örneklerin çok sayıda ve farklı bölgelerden toplanmasına karşın en yüksek MDR izolatları %50,9 oranı ile Adana ilinde yoğunlaştığı,

2-Adana ilindeki oransal yüksekliğin *M tuberculosis*'in yaygınlığı kadar, hasta seçiminde gösterilen özene bağlı olabileceği, bu açıdan bakıldığında da VSD'de çalışan hekim ve personelin tecrübesinin önemli olduğu,

3-Bölge suşlarının spoligotyping ile %94,9 oranında kümeleştğini ve suşların 19 küme içerisine dağıldıkları,

4-En büyük kümeyi 53 izolat ile T1 kümesinin oluşturduğu, bu kümenin MIRU-VNTR ile yakın ilişkili 3 küme ye dağıldığı, yani MIRU-VNTR'ın spoligotyping yöntemine göre daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu,

5-Adana'da ikamet eden iki hastadan M tuberculosis Beijing suşunun izole ve identifikasyonu ile bu suşun artık ilimize yerleştiği yani ithal hasta yerine yerleşik hastada bu suşların görülebildiği,

6-IS6110 ile belirlenmiş kümelerdeki izolatlarda değişen tekrar sayılarının ayırım gücünü dahada artırdığı ancak bu yöntemin tek başına diğer yöntemler gibi anlamlı sonuçlar üretmediği görülerek *M tuberculosis* tür tayini, klonal ilişkinin tespiti ve sürveyansında spoligotyping ve 15 lokus MIRU-VNTR yöntemlerinin tatminkar sonuçlar üretebildiği,

7-Bölgemizde MDR suşların insidansında artış olduğu,

8-MDR suşlarda RIF ve INH dışında en az 1 anti-Tb ilaç direncinin arttığı,

9-MDR suşların klonal olarak benzerlik göstermedikleri, yani yeni yeni dirençli suş klonlarının ortaya çıktığı , bu varsayımdan hareketle de direncin sıklıkla sekonder olduğu,

10-Bu sebeple hekim-laboratuvar-hasta ilişkisini güçlendirecek tedbirlerin Daha güçlü uygulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- **Djelouadji Z, Raoult D, Drancourt M.** Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemic bursts with a degrading genome. *Lancet Infect Dis*, **2011**; 11:641-650.
- 2- **Kurtoğlu MG, Özdemir M, Keşli R, Özkalp B, Baysal B.** Tüberküloz Şüpheli Hastalardan *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolasyon Oranı ve Suşların BACTEC™ NAP ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Rapid™ Testleri ile Tanımlanması. *Mikrobiyol Bul*, **2011**; 45(2): 266-273.
- 3- **Yu CC, Chang CY, Liu CE, Shih LF.** Drug Resistance Pattern of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex at a Medical Center in Central Taiwan, 2003–2007. *J Microbiol Immunol Infect*. **2010**; 43(4):285–290.
- 4- **Zhao LL, Xia Q, Lin N, Liu B, Zhao X, Liu Z, Wan K.** Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for the second-line drugs susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in China, *Journal of Microbiological Methods* 91. **2012** 212–214
- 5- **Roetzer A, Schuback S, Diel R, Gasau F, Ubben T, Nauta A, Richter E, Rüsç-Gerdes S, Niemann S,**Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* typing methods in a four-year study in Schleswig-Holstein, Northern Germany. *J. Clin. Microbiol.* doi: **10.1128/JCM.05293-11**.
- 6- **Köksal F.** Tüberküloz basilinin kaynak ve evrim. *Tüberküloz Sempozyum Kitapçığı*, Malatya. **2003**; 34-47.
- 7- **Zorluer E.** Yöremizde İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarında Direnç Profili. Yüksek lisans tezi, Adana, **2010**.
- 8- **Köksal F.** *Mycobacterium tuberculosis*'te direnç problemi. I.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya. 12-16 Kasım **2011**; 92-94.
- 9- T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara İl Sağlık Müdürlüğü: Tüberküloz El Kitabı. Ankara. **2011**.
- 10- **Bloom BR, Murray CJL.** Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science*, **1992**;257:1055-64.
- 11- **Barış İY.** Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. *Toraks Dergisi*, **2002**; 3(3): 338-340.
- 12- **Barış İY.** Çağlar Boyu Tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 1-7.
- 13- Türk Toraks Derneği Kitabı.11. Baskı, İstanbul: AVES Yayıncılık, **2010**.

- 14- **Zeytinli Ü.** Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spolygotyping ve MIRU-VNTR Yöntemiyle Tiplendirilmesi. Uzmanlık tezi, Adana, **2010**.
- 15- **Leão SC, Françoise PF.** History, In: Palomino, Leão, Ritacco, editör. *Tuberculosis 2007 From Basic Science to Patient Care*, 1st ed. Buenos Aires: Emma Raderschadt, **2007**: 25-48.
- 16- **Çalık S.** Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Bölge Tüberküloz Laboratuvarına Gönderilen Balgam Örneklerinden İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarının Major ve Minör Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Adana, **2012**.
- 17- <http://www.who.int/tb/publications/globalreport/2012/pdf/fullreportcorrectedversion.pdf>
- 18- **Köksal F, Yaman A.** Farklı Bir Bakteri Topluluğu: Tüberküloz Basilleri Topluluğu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 11 - 12 Haziran **2003**, Samsun.
- 19- **Bozkurt H.** Çok İlaça Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kökenlerinde Artmış İlaç Direncinin Tespiti. Uzmanlık tezi, İzmir, **2009**.
- 20- **Barış İ.** Son bilgiler ışığında tüberküloz. *Enfeksiyon Bülteni*, **1996**; 1: 23-9.
- 21- **Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ.** Mycobacterium İçinde: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Mycobacterium. Manual Clin Microb*, 8th ed. Washington DC: **2003**; 1156-1164.
- 22- **Babacan F, Över U.** Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* complex. Rota S. Tüberküloz dışı mikobakteriler ve *Mycobacterium leprae*. İçinde Wilke Topçu, Söyletir G, Doğanay M(ed), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2*. **2002**; 1675-1698.
- 23- **Özışık N.** Çok ilaca Dirençli Tüberküloz Hastalarında BACTEC ve Agar Proporsiyon Yöntemi İle Saptanan Etionamid Direncinin Klinik Önemi. Uzmanlık Tezi. İstanbul. **2006**.
- 24- **Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS.** *Medical Microbiology*. 2nd ed. St. Louis. **1994**; 320-334.
- 25- **Gedikoğlu S.** Mycobacterium tuberculosis'in hücre yapısı. *İnfeksiyon Derg* **1997**; 11:13-17.
- 26- **Hong X, Hopfinger AJ.** Construction, molecular modeling, and simulation of Mycobacterium tuberculosis cell walls. *Biomacromolecules*. **2004**; 3:1052-1065.

- 27- **Çavuşoğlu C.** *Mycobacterium tuberculosis*'de Moleküler Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri, 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 367.
- 28- **Pfyffer GE, Brown-Elliot BA, Wallace RJ.** *Mycobacterium* İçinde Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Mycobacterium. Manual Clin Microb*, 8th ed. Washington DC: **2003**; 532-585.
- 29- **Hall GS, Howard BJ.** *Mycobacteria*. İçinde Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC, editör. *Clinical and Pathogenic Microbiology*. 2nd ed. St. Louis. **1994**; 503-529.
- 30- **Kocabaş A.** Akciğer tüberkülozu. İçinde Willke TA, Söyletir G, Doğanay M, editör. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri **2002**; 538-591.
- 31- **Ooi ST, Fekete T.** Causes of and clinical sequelae of delays in reporting species identification of mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 55, **2006**; 69–73 .
- 32- **Runyon E.H.** *Mycobacterium intracellulare*, relationship of atypical acid fast bacilli to human disease. *American Review of Respiratory Disease*, **1967**; 95: 861-867.
- 33- **Woods GL, Washington JA.** *Mycobacteria* other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis.*, **1987**; 79:275-9.
- 34- **Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST.** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**; 99(6): 3684-9.
- 35- **Noel H. Smith et al,** Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Journal of Theoretical Biology*. **2006**; 220–225.
- 36- **Peterson R.** Molecular Epidemiology of Tuberculosis. Karolinska Institutet, Sweden, **2009**.
- 37- **Clifton E.** Barry Interpreting cell wall ‘virulence factors’ of *Mycobacterium tuberculosis*. **2001**; 237-241.
- 38- **Cengiz AT.** *Mycobacteriaceae*. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi; Ankara. **1999**; 419-455.
- 39- **Dubaniewicz A.** *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins and autoimmunity in sarcoidosis; *Autoimmunity Reviews* 9. **2010**; 419–424.

- 40- **Noss EH, Pai RK, Sellati TJ**, Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19 kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, **2001**; 167: 910-918.
- 41- **Fernando L. L. Cardoso, et al.** T-Cell Responses to the Mycobacterium tuberculosis-Specific Antigen ESAT-6 in Brazilian Tuberculosis Patients; *Infection and Immunity*, Dec. **2002**; 6707–6714.
- 42- **Astarie-Dequeker C , J. Nigou, C. Passemar, C. Guilhot.** The role of mycobacterial lipids in host Pathogenesis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, **2010**; 33-41.
- 43- **Neyrolles O, Guilhot C.** Recent advances in deciphering the contribution of Mycobacterium tuberculosis lipids to pathogenesis. *Tuberculosis*, **2011**; 187-195.
- 44- **L. Dedieu et al.** Mycobacterial lipolytic enzymes: A gold mine for tuberculosis research. *Biochimie*, **2013**; 66-73.
- 45- **Rachman H, Strong M, Schaible U, Schuchhardt J, Hagens K, Mollenkopf H, Eisenberg D, Kaufmann SH.** *Mycobacterium tuberculosis* gene expression profiling within the context of protein networks. *Microbes Infect*, **2006**; 8(3):747-57.
- 46- **Yaman M.** Tüberküloz Patogenezi, Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu, 30 Nisan **1999**, İstanbul, 15-20.
- 47- **Vapur M.** Tüberkülozlu Hastaların Çeşitli Parametreler Eşliğinde Değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi, İstanbul, **2008**.
- 48- **Öztürk R.** Tüberkülozda Doğal Direnç ve Risk Faktörleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 11 - 12 Haziran **2003**, Samsun.
- 49- **Bahar Y.** Sağlık Çalışanları ve Tüberküloz Hastalarında Serum Neopterin Düzeyleri İle Tüberkülin Cilt Testi Arasındaki İlişkinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul, **2007**.
- 50- **Çakır M.** Tüberküloz İmmünolojisi, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, **1994**; 6: 409-415.
- 51- **Philips JA, Rubin EJ.** Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. 4th, Ed., New York : The McGraw-Hill Companies, **2008**: 2459-2464.
- 52- **Sesli Çetin E et al.** Mikobakterilerin klinik örneklerden izolasyonunda Löwenstein-Jensen besiyeri kültürü ve Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube 960 sisteminin değerlendirilmesi, *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* **2012**; 1: 12-16

- 53- **Özakın C, Gedikoğlu S.** Tüberküloz Tanısında Tüberküloz Laboratuvarının Rolü: Tanı ve İlaç Duyarlılık Testlerinde Rutin Laboratuvar Yöntemlerinin Değeri, 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. **2003**; 397-401, Samsun.
- 54- **Çimen Özışık N.** Çok ilaca Dirençli Tüberküloz Hastalarında Bactec ve Agar Proporsiyon Yöntemleri ile Saptanan Etionamid Direncinin Klinik Önemi. Uzmanlık Tezi. İstanbul, **2006**.
- 55- **Günel S.** Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının IS6110RFLP (restriction fragment length polymorphism) ve spoligotyping profillerinin belirlenmesi. Doktora tezi. Malatya, **2006**.
- 56- **Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA.** *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology, *BMC Microbiology*. **2006**; 6: 23.
- 57- **Durmaz, R.** Tüberkülozun Epidemiyolojik Araştırmalarında Laboratuvarın Yeri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, **2003**, 443-456.
- 58- **Rodriguez NA. et al.** Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiology* **2008**, 8: 34.
- 59- **Uzun O.** Güncel Bilgiler Işığında Enfeksiyon Hastalıkları II. Bilimsel tıp yayınevi, Ankara. **2002**; 821-903.
- 60- **Durmaz R, Özerol I.H, Durmaz B, Günel S, Senoglu A, Evliyaoglu E.** Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* 32 isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. *Microbiol Drug Resist*. **2003**; 4: 361-366.
- 61- **Kurutepe M.** Çok İlaça Dirençli Tüberküloz Hastalarında BACTEC ve Agar Proporsiyon Yöntemleri ile Saptanan Etionamid Direnci ve Klinik Önemi. Uzmanlık Tezi. İstanbul, **2006**.
- 62- **Zhang Y, Yew WW.** Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2009**;11: 1320-1330.
- 63- **Iseman MD.** Klinisyenler İçin Tüberküloz Kılavuzu. Çeviren: Ş. Özkara. Nobel. Tıp Kitabevleri, İstanbul. **2002**; 271-276
- 64- **Tahaoglu K, Kongar N, Elbek O, Tümer Ö, Kılıçaslan Z.** Türk Tabipleri Birliği Tüberküloz Raporu Birinci Baskı, Ankara: Türk Tabipleri Birliği Yayınları, **2012**.

- 65- **Jyoti A, Urvashi S, Tanu R, Jitendra NP.** Characterization of predominant *Mycobacterium tuberculosis* strains from different subpopulations of India. *Joun. Micr*, **2009**.
- 66- **Özkara S, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H.** Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı, Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı, **2003**.
- 67- T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı: Türkiye’de Verem Savaşı 2009 Raporu. Ankara. **2009**.
- 68- **Hanekoma M. et al.** *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: A template for success. *Tuberculosis*, **2011**;510–523.
- 69- **Asiimwe BB, et al.** *Mycobacterium tuberculosis* Uganda genotype is the predominant cause of TB in Kampala, Uganda. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2008**;4:386-391.
- 70- **Lari N, Rindi L, Sola C, Bonanni D, Rastogi N, Tortoli E, Garzelli C.** Genetic Diversity, Determined on the Basis of katG463 and gyrA95 Polymorphisms, Spoligotyping, and IS6110 Typing, of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates from Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. **2005**; 1617–1624.
- 71- **Molina-Torres CA, Moreno-Torres E, Ocampo-Candiani J, Rendon A, Blackwood K, Kremer K, Rastogi N, Welsh O, Vera-Cabrera L.** *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *J Clin Microbiol*. **2010**; 2:448-55.
- 72- **Chang,L., Go, EC., Hyung, H.K.,** IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism and Spoligotyping Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates for Investigating Epidemiologic Distribution in Korea. *Korean Med Sci* **2010**; 1716-1721.
- 73- **Kremer, K., Barun, M.,Van, S.,** Targeted Hybridization of IS6110 Fingerprints Identifies the W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* Strains among Clinical Isolates *JCM* May **2005**;2148–2154.
- 74- **Aggarwal, B.M.,Malhotra, B., Amita, J.,** Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from different parts of India based on IS6110 element polymorphism using RFLP analysis. *Indian J Med* April **2007**; 577-581.
- 75- **Jitendra, PM., Pragya, S., Pradyot, P.,** Role of spoligotyping and IS6110-RFLP in assessing genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in India. *Infection, Genetics and Evolution* **2008**;346-351.

- 76- **Marttila, HJ., Mäkinen, J., Marjamäki, M., Soini, H.**, Molecular genetics of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Finland, 1995–2004. *Int Tuberculing* **2008**:338–343.
- 77- **Ohkado, A., Yoshiro, M., Masaaki, M.**, Transmission of Specific Genotype Streptomycin Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* in the Tokyo Metropolitan Area in Japan *BMC* **2009**,:138.
- 78- **Watson, FM., Van den B., Delpech, V., Drobniewski, F.**, Molecular epidemiology of tuberculosis in England, 1998 *Int Tuberculing* **2009**:201–207.

ÖZGEÇMİŞ

25.07.1990 tarihinde Adana’ da doğdu. İlkokula İsmet İnönü İlköğretim okulunda başlayıp, ilkokul ve ortaokulu Adana Gündoğdu Kolejin’i bitirdi. 2007 yılında Özel Gündoğdu Fen Lisesi’nden mezun oldu.2011 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirdi. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitime başladı.