

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE İZOLE EDİLEN
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARININ
TÜR TAYİNİNDE IS6110-RFLP YÖNTEMİNİN KULLANILMASI**

Ayşe KARACALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

ADANA 2010

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE İZOLE EDİLEN
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARININ
TÜR TAYİNİNDE IS6110-RFLP YÖNTEMİNİN KULLANILMASI**

Ayşe KARACALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr.Fatih KÖKSAL

**Bu çalışma TF2010 YL3 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA 2010

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tez çalışmamı yönlendiren, emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen, sabırla hep yanımda olan danışman hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr.Fatih Köksal' a, değerli hocalarım Prof. Dr. Fügen Yarkin' a, Prof. Dr. Akgün Yaman ve Prof. Dr. M. Macit İlkit'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince her zaman yardımlarını gördüğüm bölüm sekreterimiz Suna Gökmen'e, tezimin her aşamasında bana destek olan başta Arş.Gör.Ülkü Zeytinli'ye, Yük. Lis. Öğr. Sitti Çalık'a ve değerli asistan, biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe KARACALI

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1-GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2.Epidemiyoloji	5
2.2.1 Dünyada Tüberküloz	6
2.2.2 Türkiye’ de Tüberküloz	7
2.3 Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikler	9
2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması ve Evrimi	11
2.5. Laboratuar Tanı	15
2.5.1. Mikroskopi	15
2.5.2. Kültür	15
2.5.3. Fenotipik Yöntemler	17
2.5.4. Genotipik Yöntemler	18
2.5.4.1 IS6110-RFLP(Restriction fragment length polymorphism)	19
2.5.4.2 Spoligotyping	22
2.5.4.3. MIRU-VNTR	23
3-GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. DNA Ekstraksiyonu	25
3.1.1. Sıvı besiyerinden DNA Ekstraksiyonu	25
3.1.2. Koloniden DNA ekstraksiyonu	26
3.2. IS6110-RFLP	26

3.2.1.Prop Hazırlanması	26
3.2.2. Probe İşaretlenmesi	27
3.2.3. IS6110-RFLP Prosedürü	27
3.3. IS6110-RFLP Metodunda Kullanılacak Çözeltiler	30
3.3.1.Gel Elektroforezi için gerekli çözeltiler	30
3.3.2. Southern blot için gerekli çözeltiler	30
3.3.3. Hibridizasyon için kullanılan çözeltiler	31
3.3.4.Probe işaretleme reagenleri	32
3.3.5. Hibridizasyon yıkama çözeltileri	32
3.3.6. IS6110-RFLP çözeltileri	32
4.BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
7. KAYNAKLAR	43
8. ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Türkiye de 1991-2007 yılları arasında tüberküloz insidansı	8
Şekil 2: Mikobakteri hücre duvarı yapısı	10
Şekil 3: Mikobakteri hücre duvarı porin kanal yapısı	11
Şekil 4: <i>M. tuberculosis</i> kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki	15
Şekil 5: IS6110-RFLP yönteminin şematik görüntüsü	21
Şekil 6: IS6110-RFLP görüntüsü	22
Şekil 7: <i>M. tuberculosis</i> genomundaki 41 MIRU bölgesi	25
Şekil 8: PCR-RFLP Fragment poliformizminin görünümü	36

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Türkiye de 1991-2007 yılları arasında tüberküloz insidansı	8
Şekil 2: Mikobakteri hücre duvarı yapısı	10
Şekil 3: Mikobakteri hücre duvarı porin kanal yapısı	11
Şekil 4: <i>M. tuberculosis</i> kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki	15
Şekil 5: IS6110-RFLP yönteminin şematik görüntüsü	21
Şekil 6: IS6110-RFLP görüntüsü	22
Şekil 7: <i>M. tuberculosis</i> genomundaki 41 MIRU bölgesi	25
Şekil 8: PCR-RFLP Fragment poliformizminin görünümü	36

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Runyon Sınıflandırması	13
Tablo 2: Woods ve Washington sınıflandırması	14
Tablo 3: <i>M.tuberculosis</i> kompleksi türlerin koloni morfolojileri ve biyokimyasal Özellikleri	19
Tablo 4: DIG random primed DNA işaretleme kiti	34
Tablo 5 : IS6110 kopya sayısına göre küme oranları	36
Tablo 6: IS6110 kopya sayısı ve SIRE sonuçları	37

KISALTMA LİSTESİ

ARB:	Asido Resistant Bacil
ADC:	Asit-albumin-dekstroz
BCG:	Bacillus Calmette Guerin
CDC:	Center's for Desease Control
DGT:	Doğrudan Gözetim Tedavisi
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DR:	Direct Repeat
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EMB:	Etambutol
ETR:	Exact Tandem Repeat
EZN:	Erlich Ziehl Nelsen
INH:	İzoniazid
IS:	Insertion sequence
OADC:	Oleik asit-albumin-dekstroz
MDR:	Multi Drug Resistant
MIRU:	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit
MOTT:	Mycobacterium Other Than Tuberculosis
MTK:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi
PAS :	Para-amino Salisilik Asit
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PE-PGRS:	Polymorphic Guanine-Cytosine Rich Sequence
PPD:	Purified Protein Derivative
PZA:	Pirazinamid
RD:	Region of Difference
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF:	Rifampisin
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism
TCH:	Tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid
VNTR:	Variable Number of Tandem Repeat
XDR:	Extensive Drug Resistant

ÖZET

Çukurova Bölgesinde İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* İzolatlarının Tür Tayininde IS6110-RFLP Yönteminin Kullanılması

Tüberküloz günümüzde hala tüm dünyada görülen ve giderek önem kazanan halk sağlığı problemlerinden biridir. HIV epidemisi ile birlikte gelişmiş ülkelerde de yeniden artış trendine giren *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonlarının kontrolünde; yeni, daha hızlı, ucuz, sensitif ve spesifik tanı yöntemleri ile daha etkili anti-tüberküloz ilaçların yaratılması ve mikroorganizmanın toplum içerisindeki hareketleri ile bulaş yollarının tespitine imkan sağlayacak genom düzeyinde tanımlama yapabilen epidemiyolojik yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma ile Çukurova bölgesindeki 2007-2010 yılları arasında izole edilen *M. tuberculosis* izolatlarının IS6110-RFLP yöntemi ile tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya 2007- 2010 yılları arasında Çukurova bölgesinde bulunan farklı hastane ve verem savaş dispanserlerinden akciğer tüberkülozu veya temas kuşkusu ile laboratuvarımıza gönderilen hastalara ait klinik materyalden izole edilen 230 *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşu dahil edilmiştir. Suşlar klonal düzeyde tanı amacı ile IS6110-RFLP yöntemi ile değerlendirilmiştir.

IS6110 RFLP analizi ile çalışılan 230 izolattan 146 farklı patern belirlenmiştir. Yüz yirmi örneğin bulunduğu 35 küme (%29,1), 62 özgül profil (%26,9), 36 benzer suş (%15,6) bulunmuş olup 12(%5,2) örnek tanımlanamamıştır. Bu çalışma sonunda, ülkemizde yapılan diğer IS6110-RFLP çalışmalarına ait sonuçlar kıyaslandığında kümeleşme oranının daha düşük olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: IS6110-RFLP, *Mycobacterium tuberculosis*,

ABSTRACT

Genotyping Of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains Isolated From Çukurova Region On IS6110 Element Polymorphism Using RFLP Analysis

Tuberculosis is one of the major public health issues in the developing countries of the world. In control of *Mycobacterium tuberculosis*, which has begun to increase together with the HIV epidemic in developed countries, specific diagnosis methods which is new, faster, cheap, sensitive and creation more effective anti-tuberculosis medicines, which can identify the public travel route and the transmission ways in genome level, epidemiological methods are required. In this study, isolated between 2007-2010 in Cukurova Region M.tuberculosis isolates by IS6110-RFLP typing method is aimed.

In this study, 230 *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from the clinical materials of patients that have pulmoner tuberculosis or contact suspicious which were sent our laboratory from the different hospitals and Tuberculosis Dispansery in the Cukurova Region between the dates of 2007-2010 were used. Strains were evaluated with IS6110-RFLP typing method for clonal level diagnosis.

Studied 230 isolates with IS6110 RFLP analysis of 146 different patterns were identified. One hundred and twenty samples contain 35 clusters (29.1%), 62 specific profile (26.9%), 36 strains were similar (15.6%) and 12 samples (5.2%) unidentified. According to this study, the rate of clustering was lower than results of other IS6110-RFLP studies done in our country.

Keywords: IS6110-RFLP, *Mycobacterium tuberculosis*

1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTK) olarak tanımlanan bir grup mikroorganizma tarafından oluşturulan, tanı, tedavi ve kontrol yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen, başta gelişmekte olan ülkeler olmak üzere tüm dünyada halk sağlığını tehdit eden, kronik bir hastalıktır¹.

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya nüfusunun üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektidir. Özellikle HIV pandemisinden sonra kötü ekonomik şartlara sahip ülkelerde, göçler ve genel sağlık sistemi ile birlikte tüberküloz kontrol programlarının çökmesi epidemiyi alevlendirmiş ve gelişmiş ülkeleride içine alan pandemi haline dönüştürmüştür. Her yıl, % 85'i gelişmekte olan 22 ülkelerden olmak üzere, yaklaşık olarak 9 milyon yeni akciğer tüberkülozu vakası bildirilmekte ve yine çoğu bu ülkelere mensup, genç yetişkinlerden olmak üzere yaklaşık olarak 2-3 milyon hasta bu büyük pandemide kaybedilmektedir.

Diğer taraftan *M.tuberculosis*'in artan insidansının yanı sıra en az iki major anti-tüberküloz ilaca dirençli (MDR) ve bunların yanı sıra 2 minor ilaca dirençli (XDR) suşların ortaya çıkışı ve bu suşlar ile oluşan enfeksiyonların klasik tüberküloza göre çok daha malign ve mortal seyretmesi, Tüberkülozu “yeniden önem kazanan” global bir sağlık problemi haline getirmiştir. Özellikle Çin kökenli olmasına rağmen batı dünyasında da hızla yayılım trendinde olan *M.tuberculosis* kompleksine ait Beijing suşları MDR olup bu suşlarda XDR gelişme riski oldukça yüksektir. Bu sebeple de genel olarak komplekse ait tüm suşların ancak özellikle Beijing suşlarının tür düzeyinde tanımlanmaları dirençli suşların izlenmesi ve yayılımının engellenmesi açısından hayati öneme sahiptir. Tüberküloza bağlı bulaş ve ölümlerin trendinin düşürülmesinde; hızlı, ucuz ve yüksek duyarlılıkta yeni tanı yöntemleri ve daha etkin anti-tüberküloz ajanların geliştirilmesi kadar bulaşın önlenmesi de stratejik önem taşımaktadır. Bu bağlamda tüberkülozun epidemiyolojik özelliklerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir³

M.tuberculosis kompleksi içerisinde yer alan türlerin tanımlanmasında son derece kompleks, uzun sürede sonuç veren, pahalı ancak yüksek duyarlılığa sahip MIRU-VNTR ve spoligotipleme gibi yöntemlerin yanı sıra, daha kısa sürede sonuç veren ancak düşük ayırım gücüne sahip ticari kart testler kullanılmaktadır. Bu testlere alternatif olarak sadece *M.tuberculosis* kompleksi türlerde genomda yer alan sayı, yerleşim ve büyüklükleri türler arasında farklılık gösteren IS6110 segmentinin hedef alan PCR-RFLP bazlı prop hibridizasyon yöntemi hem yüksek ayırım gücüne sahip hem de laboratuvar şartlarında uygulama kolaylığı olan hızlı ve nispeten ucuz bir yöntemdir.

Biz bu çalışmada bölgemizdeki 7 İlde hizmet veren 17 Verem Savaş Dispanseri ile birisi Göğüs Hastalıkları Hastanesi, ikisinde Devlet Hastanesi olmak üzere 3 yataklı sağlık kuruluşunda takip edilen hasta veya temas şüphelisi olan kişilerden alınan ve laboratuvarımıza gönderilen balgam ve BAL örneklerinden izole edilen *M. tuberculosis* kompleksi içerisinde yer alan 230 *M. tuberculosis* izolatının genotipik özelliklerini IS6110-RFLP yöntemi ile araştırdık. Çalışmanın öncelikli amacı bölgemizdeki *M. tuberculosis* klinik izolatlarının genotip düzeyinde tanımlanması ve bölgede egemen olan kompleks üyelerinin tespitidir. Bu bağlamda ileride sürdürülecek 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 uzun vadeli beklentidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Halk arasında verem olarakta tanımlanan Tüberküloz(TB), insanlık tarihi kadar eskilere dayanan bir hastalıktır. TB etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis*'in geçmişinin 150 milyon yıldan daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Mikobakterilerin 35.000-15.000 yıl önce ortak bir atadan köken aldığı gösterilmekte ve atasal mikobakterilerin 3 milyon yıl önce Doğu Afrika'da Afrika boynuzundan ilk insanla birlikte evrimleşerek çıktığı ve buradan tüm Dünya'ya yayıldığına inanılmaktadır¹. İnsanların, M.Ö 8000 yıllarına kadar uzanan iskelet kalıntılarında hastalık izlerine rastlanmasıyla mikobakterilerle karşılaşıldığı düşünülmektedir. Bu hipotez M.Ö. 4000-2400'lü yıllarda eski Mısır'da Firavunlar döneminden kalma Thebus bölgesinde bulunan 85 mumyadan alınan organik materyalden ARB, PCR ve IS6110- RFLP ile ispatlanmış, spoligotipleme ile de suş tayini yapılabilmektedir². Yine bu döneme ait kemik kalıntılarında tüberküloza ait Pott's hastalığına bağlı kemik lezyonlarının gösterilmesi, vazo ve testi gibi sanat eserleri üzerinde bulunan figürlerde kemik lezyonlu hastaların tanımlanması bu dönemde tüberkülozun yaygınlığı hakkında fikir vermektedir³. Mısır'da, M.Ö. 5000 yıllarına ait, Hindistan'da M.Ö. 3300 ve Çin'de M.Ö. 2300 yıllarına ait kaynaklarda tüberkülozu düşündüren ifadeler bulunmaktadır^{1,4,5}. M.Ö. 1500-500 ve M.Ö. 500-0 yıllarında Nil nehri vadisinde iki büyük tüberküloz epidemisi kaydedilmiştir. Bu salgınlardan sonra hastalığın görülme oranı ani olarak düşmüştür. M.S. 500-1500 yıllarında Kuzey Amerika'da ve son 1000 yılda Avrupa'da çeşitli epidemiler tanımlanmıştır. 17. ve 18. yüzyıllarda Avrupa nüfusunun %70'i tüberküloza yakalanmış ve bunların yedide biri ölmüştür^{6,7,8}.

Dünyada verem epidemileri dalgalanmalar göstermiş olup M.Ö. 1500 – 750 yılları arasında Nil vadisinde, 1500 – 50 arasında Eski Yunan'da; 250 – 1500 süresinde Amerika'da, 1000 - 2000 arasında da Avrupa'da epidemiler yapmıştır⁷. Hipokrat M. Ö. 460'lı yıllarda erime, tükenme anlamına gelen 'fitizis' terimini kullanmıştır. ilk olarak Aristo (M.Ö. 354–322) bu hastalığın bulaşıcı olduğunu düşündüren bir özelliğinin farkına varmıştır. Romalı Celsus M.Ö. 30-50 yıllarında tüberkül tanımını literatüre

geçirmiştir^{9,10}. MS. II.yy'da F. Sylvius ise tüberkülozdan ölen hastaların akciğerlerinde tüberkül olarak adlandırdığı küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstermiştir¹⁰. Pierre Desault (1675–1737) ise hastalığın bulaşıcı olduğunu, temel bulaştırıcı unsurun ise balgam olduğunu belirtmiştir. Robert Koch tüberkülozdan ölen bir hastanın akciğerindeki lezyonlarda basili göstermiş, bunu kültürde üretmiş ve üretilen basil ile deney hayvanlarında hastalık oluşturmuştur. Böylece Koch 1882 yılında Berlin Fizyoloji Derneğinde tüberkülozun *M. tuberculosis* tarafından oluşturulduğunu kanıtlamıştır².

Yirminci yüzyılın başlarında ilk senatoryumun açılmasıyla tüberküloz tedavisinde farklı bir yaklaşım başlamıştır. F. Seibert 1930'lu yılların sonunda "old tüberkülini saflaştırmıştır ve elde edilen saflaştırılmış protein türevi (PPD) ile tüberküloz enfeksiyonu tespit edilmeye başlanmıştır. Calmette ve Guerin isimli araştırmacıların 1921 yılında Fransa'da ilk tüberküloz aşısı Bacillus Calmette-Guerin (BCG)'i geliştirmişlerdir. Bu aşı II.Dünya Savaşından sonra tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır^{5,11,6,7}. 19. yüzyılın sonlarında tüberküloz salgını, Osmanlı İmparatorluğu'nda büyük bir halk sağlığı sorunu olmuş, Balkan Savaşları ve 1. Dünya Savaşı'ndaki yoğun yoksulluk koşullarında Anadolu'ya yayılmaya başlayan hastalık, 1940'ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmış ve bu dönemde en sık görülen ölüm nedeni olmuştur^{6,7}.

Tüberküloz tarihinde yeni bir dönem 1940'larda ABD'de streptomisin(STR) keşfi ile başlamıştır⁶. STR'nin keşfi ile tüberküloz tedavisinde kemoterapi dönemi başlamıştır. Aynı yıl İsveçli bilim adamı J. Lehman salisilik asidin para-amino tuzunu sentezleyerek para-amino salisilik asit (PAS)' in tüberküloz tedavisinde kullanımını sağlamış ve bu iki ilacın kullanıma girmesiyle tüberküloz tedavisinde iyi sonuçlar alınmaya başlanmıştır. Tek başına kullanılan bu ilaçlara kısa zaman içinde direnç gelişimi yeni ilaç bulma çabalarını da zorunlu kılmıştır. 1952 yılında Robizek ve Selikof tarafından izoniazid (INH)'in bulunmasından sonra üç ilaçla 18-24 ay süren kombine tedavi uygulanması sonucu tüberküloz tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir. 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB) ve 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur^{1,12}.

Yetmişli yıllarda batı ülkelerinde tüberküloz sorununun azaldığı düşünüldüyse de 1985 yılından itibaren tüberküloz insidansının artmaya başladığı görülmüştür. Bu

ülkelerde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilen ve erken tanı, tedavi ve aşılamaı öneren tüberküloz kontrol programları 1960'lerden sonra uygulanmaya başlanmış ancak 1990'lı yıllarda bu programların yetersiz olduğu görölmüştür ^{1,10}.

Ülkemizde tüberküloz ile etkin mücadele 1950'li yıllarda başlatılmıştır. Çıkartılan bir yasa ile 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur⁸. Tüberküloz günümüzde AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*-kazanılmış bağışık yetmezlik sendromu) insidansının arttığı bölgelerde salgın yapma özelliğini devam ettirmektedir ¹³.

2.2.Epidemiyoloji

Tüberküloz yirminci yüzyılda kontrol altına alınmaya başlanmış olmasına rağmen günümüzde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. DSÖ raporlarına göre Dünya nüfusunun 1/3'ü hasta olmaksızın tüberküloz basilini almış durumdadır ^{14,15}. Günümüzde, tüberküloz ilaçlarının doğru kombinasyonlarında ve hasta tarafından düzenli kullanılması durumunda, hastalık genellikle tedavi edilebilmektedir. Önemli başarılarla rağmen bulaşıcı bir hastalık olan tüberküloz dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Mevcut tahminlere göre yılda yaklaşık 9 milyondan fazla yeni hasta ve 2 milyon ölüm belirtilmektedir. Küresel bir salgın olmasına rağmen, TB'den yoksul ülkeler daha fazla etkilenmektedir ve bu ülkelerde TB % 98 oranında ölümle sonuçlanmaktadır¹². Tüm TB olgularının % 95'i, Dünya nüfusunun yaklaşık olarak % 86'sını oluşturan Batı Afrika ülkeleri gibi düşük ekonomi kaynaklı ülkelerde görölmektedir. Bu yüksek insidansın bu bölgelerde görülen HIV epidemisine bağlı olduğuna inanılmaktadır^{6,12}.

Tüberkülozdan korunma ve etkin kontrol önlemlerinin geliştirilmesinde hastalar arasındaki yayılmanın derecesi ve kaynağın bilinmesi çok önemlidir. Bunun için izolatlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılması gereklidir. Mikobakterilerin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerinden yararlanılarak cins ve tür düzeyinde tanımlamaları yapılabilmektedir. Tür düzeyinde tanımlama tüberkülozun etiyolojisini aydınlatma bakımından yeterli olabilmek, ancak salgınlar esnasında izole edilen aynı tür içindeki suşları birbirlerinden ayırt edememektedir.^{12,16,17} ¹⁸ Oysa bir salgında kaynak tespiti ve salgın suşlarının tanımlanmasında izolatlar arasında yüksek ayırım gücüne sahip tekniklerle salgın suşlarının diğer suşlardan ayırt edilmesi büyük önem

taşımaktadır. Nitekim HIV enfeksiyonu tüberküloz epidemiyolojisinde önemli değişimlere neden olmuş, ABD gibi gelişmiş ülkelerde tüberkülozun daha genç hastalarda rastlanmaya başlamış, reaktivasyona göre primer tüberküloz olgularının artmış ve çoklu ilaca dirençli tüberküloz sayısında artışlar kaydedilmiştir. Amerika ve Afrika'dan sonra Güney Doğu Asya ve Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde de bu iki hastalığın birlikteliği artış göstermiştir^{19,20,21}. Bütün bu veriler tüberküloz kontrol programlarının moleküler düzeyde elde edilecek epidemiyolojik bilgilerin ışığında gözden geçirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

2.2.1 Dünyada Tüberküloz

Tüberkülin testi pozitifliği esas alınarak yapılan değerlendirmede dünya nüfusunun 1/3'ünü oluşturan yaklaşık 1.7 milyar kişinin tüberküloz basili ile enfekte olduğu ve 2015 yılına kadar hasta sayısının 50 milyona ulaşacağı, bunların üç milyonunun HIV ile enfekte olacağı ve 30 milyon insanın da bu nedenle öleceği tahmin edilmektedir.^{22 23}.

Dünya nüfusunun % 25'inin yaşadığı gelişmiş ülkelerde yıllık tüberküloz insidansı % 0.1-% 0.01 düzeylerindedir ve bu oran her yıl % 10'dan fazla düşmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde ise insidans % 0.5-2.5 arasında değişmekte ve enfeksiyonun hızı daha yavaş azalmaktadır.²² Günümüzde küresel tüberküloz sorunu büyük oranda, yetersiz kontrol programlarının uygulandığı Güneydoğu Asya, Sahra Altı Afrika ve Doğu Avrupa ülkeleri ile yüksek tüberküloz / HIV birlikteliğinin bulunduğu Afrika ülkelerinden kaynaklanmaktadır. 1980'den sonra giderek artan HIV enfeksiyonu insidansı bugün birçok ülkede tüberkülozlu hasta sayısının belirgin şekilde artışından sorumlu görünmektedir²².

DSÖ tüberküloz kontrolünde 'Milenyum Gelişme Hedefi' belirlemektedir. Buna göre DSÖ, yayma pozitif olguların %70'inin tespit edilmesini, bu olguların % 85'inin başarıyla tedavi edilmesini, 2015 yılına kadar dünyada tüberküloz insidansının azalmaya başlatılması ve durdurulmasını, 1990 yılı ile kıyaslandığında 2015 yılına kadar prevalans ve ölüm oranlarının yarıya indirilmesini hedeflemektedir^{23,11}.

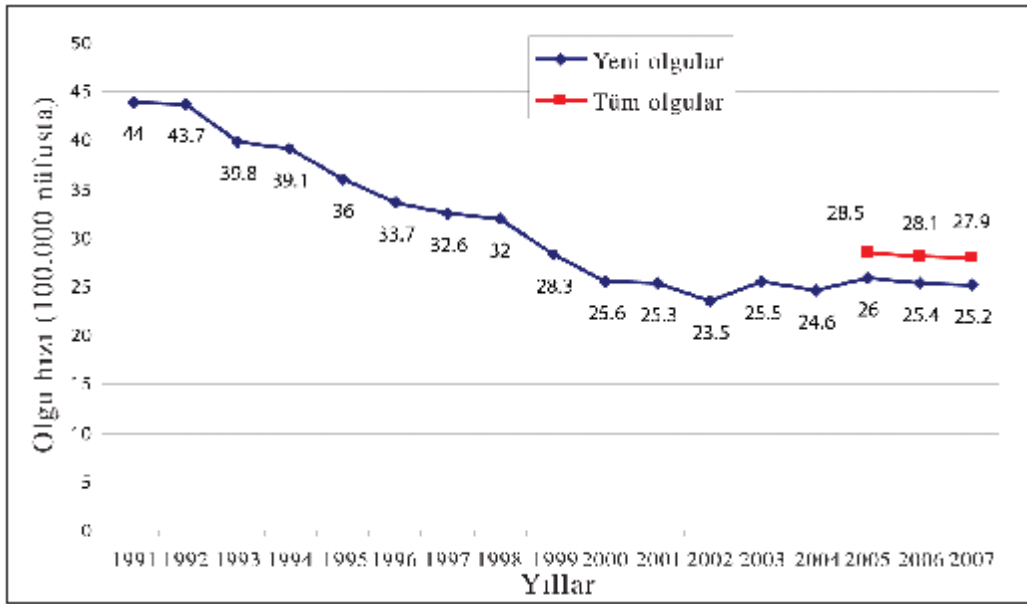
DSÖ 2008 Küresel Tüberküloz Raporu'na göre, 2006 yılı içinde bildirilen olgu oranı (prevalans) 5.392.826 (82/100.000), yeni yayma pozitif olgu oranı

2.531.975 (38/100.000) olarak verilmektedir. Olguların %46.9'u yayma pozitif olarak bildirilmektedir. 2003 yılı için insidans 8.8 milyon olarak bildirilirken, 2005 yılı için 9.1 milyon olarak verilmektedir. 2006 yılı için tahmini prevalans oranı 14.424.343 (219/100.000), insidans oranı 9.157.021 (139/100.000), yayma pozitif olgu oranı 4.068.011 (62/100.000) olarak verilmektedir^{23,11}.

2.2.2 Türkiye' de Tüberküloz

İlk Veremle Savaş Cemiyeti'nin 1918 yılında kurulduğu Türkiye'de, Cumhuriyet' in ilk yıllarından beri tüberkülozla mücadele sürdürülmüştür. 1950'lerde %0,25 olan hastalık prevalansı 1975'te %0,1'e düşmüş, bu yıllar arasında yıllık enfeksiyon risk oranında % 10'luk azalma görülmüştür. Fakat 1970'li yılların başında 'tüberkülozun artık kontrol altına alındığı' şeklindeki resmi açıklamalar, bu yıllardan sonra kamuoyunun ve devletin konuya ilgisinin giderek azalmasına neden olmuş ve 1977'den sonra yapılan çalışmalarda enfeksiyon riskinin artmaya başladığı görülmüştür⁹.

Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı'nca, Avrupa Tüberküloz Sürveyansı'nın veri standartları esas alınarak hazırlanan, Türkiye'de Verem Savaşı 2009 Raporu'na göre Kayıtlı TB hastalarının toplam sayısı 2006 yılında 20.526 iken 2007 yılında 19.694 olmuştur ve bir yılda %4 düşüş görülmüştür. Kayıtlı 19.694 hastanın 17.781'i (%90,3) yeni olgu, 1.913'ü (%9,7) tedavi görmüş olgudur. Hastaların 12.381'i (%62,9) erkek, 7.313'ü (%27,1) kadın hastadır. Akciğer tüberkülozu olan 13.690 hastadan 12.219 (%89,3)'üne mikroskopi yapılmış ve akciğer tüberkülozluların %64,3'ünde (8.797) yayma pozitif bulunmuştur. Hem mikroskopi hem de kültür yapılma oranları ile pozitiflik oranlarında bu yıl geçen yıllardan daha başarılı sonuç alınmıştır. İlaç duyarlılık testi (İDT) yapılan 4.917 hastanın %20,8'inde en az bir ilaç direnci tespit edilirken, 240 (%4,9) çok ilaca dirençli TB hastası bulunmuştur¹⁴. Bu oranlar diğer ülkeler ile karşılaştırıldığında azımsanmayacak bir değerdir ancak ülkemizde hasta bildirimleri ve kayıtlama sistemlerinde önemli sorunlar olması nedeniyle gerçek tüberküloz görülme sıklığının daha fazla olması gerektiği de göz ardı edilmemelidir²².



Şekil 1. Türkiye de 1991-2007 yılları arasında tüberküloz insidansı¹¹

Ülkemizin TB insidansı açısından başarılı kontrol programı uygulamış ülkeler ile, başarısız programlar uygulamış ülkeler arasında bir konumda olduğu görülmektedir²⁴. Bölgelere göre bakıldığında, olgu hızı 100.000/48.6 ile Marmara Bölgesi'nde en fazla görülmektedir. Bunu, Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi izlemektedir. Bunun nedeni, Marmara Bölgesi'nin, düşük gelirli bölgelerden çok fazla göç alması ile açıklanmaktadır²⁰.

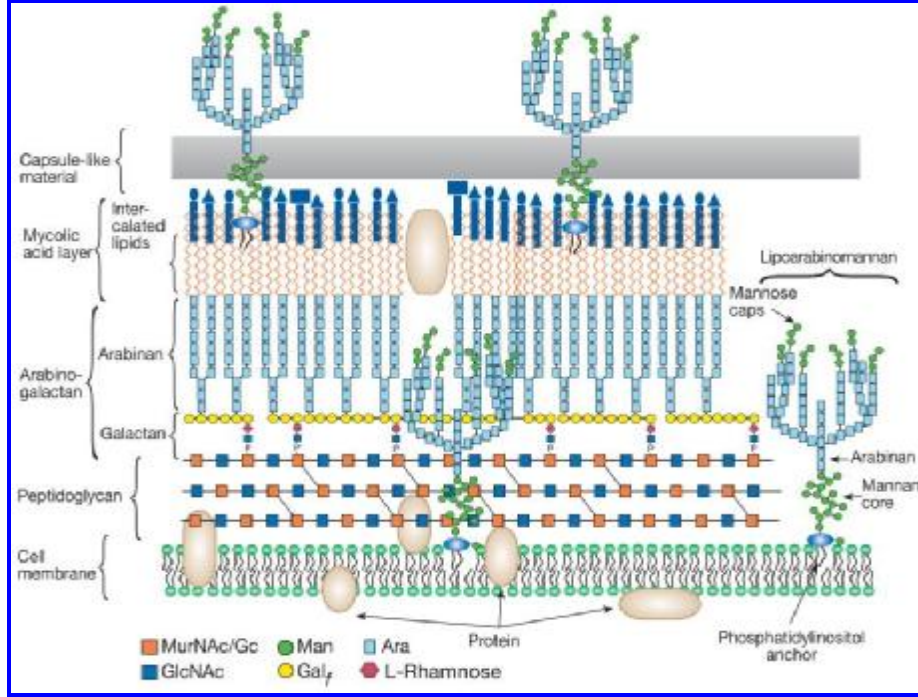
Sağlık Bakanlığı'nın yayınlarına göre, 2007'de bölgelere göre insidans ise; Karadeniz Bölgesinde 32/100.000, Marmara Bölgesinde 44.8 /100.000, Ege Bölgesinde 23/100.000, İç Anadolu Bölgesinde 15/100.000, Doğu Anadolu Bölgesinde 19.4 /100.000, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde 22,1/100.000, Akdeniz Bölgesinde 17.8/100.000 olmak üzere ülke genelinde 27.9 /100.000 olarak verilmiştir.²⁴.

İllere göre bakıldığında, nüfusa göre tüberküloz olgu hızı sırasıyla en fazla 100.000/55.9 ile İstanbul'da, ardından 100.000/47.9 ile Edirne ve 100.000/51.2 ile Bartın'da görülmektedir. İzmir'de ise bu oran 100.000/29 ile Türkiye ortalamasının üzerinde bulunmaktadır^{11,20}.

2.3 Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikler

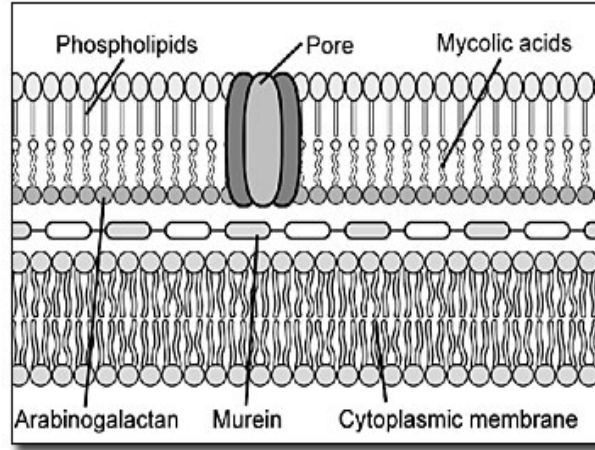
Mycobactereacea ailesinin tek cinsi olan mikobakteriler; aerop, sporsuz, katalaz üreten, hafif kıvrık veya düzgün çomak şeklinde, dallanabilen, 0.2- 0.6 µm eninde, 1.0- 10 µm boyunda mikroorganizmalardır. Yavaş üreme hızına sahip olan mikobakteriler 18-24 saatte ikiye bölünmektedir ¹¹. Katı besi yerinde kolonilerin gözle görülmesi, hızlı üreyenlerde 7 günden az, yavaş üreyenlerde 7 günden fazla sürmekte; klinik örneklerden primer kültürde üreme süresi 8 hafta kadar sürebilir. Optimum üremesi için gerekli ortam pH' sı 6.5- 6.8 ve CO₂ oranı %5-10'dur. Üreme için uygun ısı ortalama 37 °C, türden türe 30°C - 45°C arasında değişmektedir. Mikobakteriler canlılığını +4°C' de haftalarca, -70°C' de aylarca koruyabilir. Standart kültür ortamında ortalama 10-15 günde gözle görünür koloni oluşturmaktadırlar. Son zamanlarda otomatize sistemlerde (BACTEC TB 460, MGIT 960, MB/BacT Alert, Myco-ESPII ve MYCOLOR TK) katı-sıvı besi yerleri kullanılarak bu süre on güne kadar inmiştir²⁸. Koloni morfolojisi türler arasında değişmekle birlikte S (smooth) ya da R (rough) pigmentli veya pigmentsiz olabilir. Bazı türler pigment oluşturmak için ışığa gereksinim duyarken (fotokromojen) diğerleri ışıktaki da karanlıkta da pigment oluşturabilir (skotokromojen)^{3,27}.

Hücre duvarları lipit içeriği bakımından zengindir. Bu nedenle alkol, asit, alkali ve kuru ortama karşı direnç gösterirler. Mikobakteriler fenol içinde çözündürülen bazik fuksinin yoğun eriyikleri ile [Kinyoun veya Ehrlich- Ziehl- Neelsen (EZN) yöntemleri ile] boyandıklarında aldıkları boyayı %3'lük asit alkolle renksizleştirme işleminden sonra bırakmazlar. Bu özelliklerinden dolayı aside dirençli bakteriler (ARB) olarak da adlandırılırlar. Aside dirençlilik özellikleri laboratuvar tanısında kullanılan önemli bir kriterdir. Kinyoun veya EZN boyama yönteminde renk giderme işleminden sonra zeminin boyanabilmesi için zıt boya olarak metilen mavisi kullanılır ve mikroskopik incelemede tüberküloz basilleri mavi zeminde kırmızı çomakçıklar şeklinde görülürler²⁹. Tek tek küçük zincirler veya demetler halinde bulunabildiği gibi klinik örneklerde X, V, L harfleri oluşturacak biçimde de bulunurlar (%62-70)²⁸.



Şekil 2. Mikobakteri hücre duvarı yapısı³⁰

Hücre duvar yapıları diğer bakterilerden farklı olup ana iskeletini peptidoglikan ve arabinogalakattan molekülleri oluşturur. Ayrıca arabinogalakattan ve glikolipidler arasında yer alan uzun zincirli doymuş yağ asitlerinden olan mikolik asit hücre duvarının önemli yapılarındandır¹⁶. Hücre duvarının bu kompleks yapısında en iç tabaka, diğer bakterilerde de görülen plazma membranıdır. Orta tabakası peptidoglikan, arabinogalakattan, mikolik asitler, açıl trehalozlar, oligosakkarid içeren lipidler ve fosfotidilinozitolün glikozil derivatlarından oluşmaktadır. Hücre duvarının en dışında bakteriye şekli veren hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandıran peptidoglikan yapı bulunmaktadır. Benzer kor yapısı mikobakteriler dışında korinobakteriler ve nokardiyalarda da görülür. Mikolik asitlerin dışında çok sayıda farklı polar veya apolar yapıda nonkovalent bağlı lipid ve glikolipidler hücre duvarında yer alır. Biyolojik aktif olan bu lipidler ve glikolipidlerin bolluğu ve asimetrik dizilişleri hücre duvarına aşırı derecede hidrofobisite kazandırır. Bu yapılar içerisinde alfa-1,4 glukon, bir arabinomannan, lipomannan ve lipoarabinomannan gibi polisakkaritler, son derece önem arz eder. Mikobakterilerin hücre duvarında gram negatif bakterilerde görülen porin proteinleri de bulunur^{27,6,9}.



Şekil 3. Mikobakteri hücre duvarı porin kanal yapısı ¹⁵

Mikobakterilerde mikolik asitler tüm hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini, hücre lipidlerinin % 60'ını oluşturlar. Mikolilarabinogalaktan peptidoglikan kompleksinde en fazla bulunan mikolik asit türü, oksitlenmiş grupları içermeyen 60 karbon büyüklüğündeki D mikolik asitlerdir. Yapısında bir çift bağ veya siklopropan içerir. D mikolik asitler *M. tuberculosis* de dahil olmak üzere bir çok mikobakteri türünde görülen major mikolik asitler olup tüm mikolik asitlerin % 25'den fazlasını oluşturlar. Mikobakterilerdeki peptidoglikan tabaka kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere gram pozitif bakterilerdeki teikoik asitin bağlanmasına benzer bir disakkarit fosforil köprü ile bir heteropolisakkarit olan arabinogalaktanı kovalent olarak bağlar. Tetrapeptit yapıda yer alan diaminopimelik asitler ile lizozimlere karşı direnç kazanırlar²⁷.

2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması ve Evrimi

Alem : Prokaryot

Bölüm: Firmicutes

Sınıf : Actinobacteria

Takım: Actinomycetales

Aile : Mycobacteriaceae

Cins : Mycobacterium

Tür : *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium cinsi Actinomycetales takımında sınıflandırılmış olup Mycobacteriaceae ailesinde yer alan tek cinstir^{28,31}. Doğada, toprakta, sularda ve çevrede yaygın olarak bulunan mikobakterilerin ilk insan topluluklarının sığırları evcilleştirmeye başlamasıyla insanlara bulaştığı düşünülmektedir³². Mikobakterilerin saprofit ve patojen olan 100'e yakın türü tanımlanmıştır¹⁶. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium ulcerans* ve *Mycobacterium bovis* BCG'nin bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri temel alınarak bu türler "*M.tuberculosis* complex" adı altında toplanmışlardır³³.

Son yıllarda özellikle AIDS 'in (Acquired Immune Deficiency Syndrome) ortaya çıkışıyla birlikte, diğer bazı mikobakteri türlerinin, *M. tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerin (MOTT) (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* ve *M. avium* complex) klinik öneminin anlaşılması, ilginin bu türler üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur^{9,6}. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerin sınıflandırılması Runyon tarafından üreme hızı, koloni morfolojisi ve pigmentasyon esas alınarak dört grupta incelenmiştir^{33,9}.

Tablo 1. Runyon Sınıflandırması¹⁵

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> <i>M. gordonae</i> <i>M. xenopi</i>	Nadir patojen	skotokromojen	yavaş
Runyon Grup 3			
<i>M. avium intracellulare</i> <i>M. avium</i> <i>M. haemophilum</i>	Fırsatçı patojen	nonkromojen	yavaş
Runyon Grup 4			
<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>	Nadir patojen	nonkromojen	Hızlı

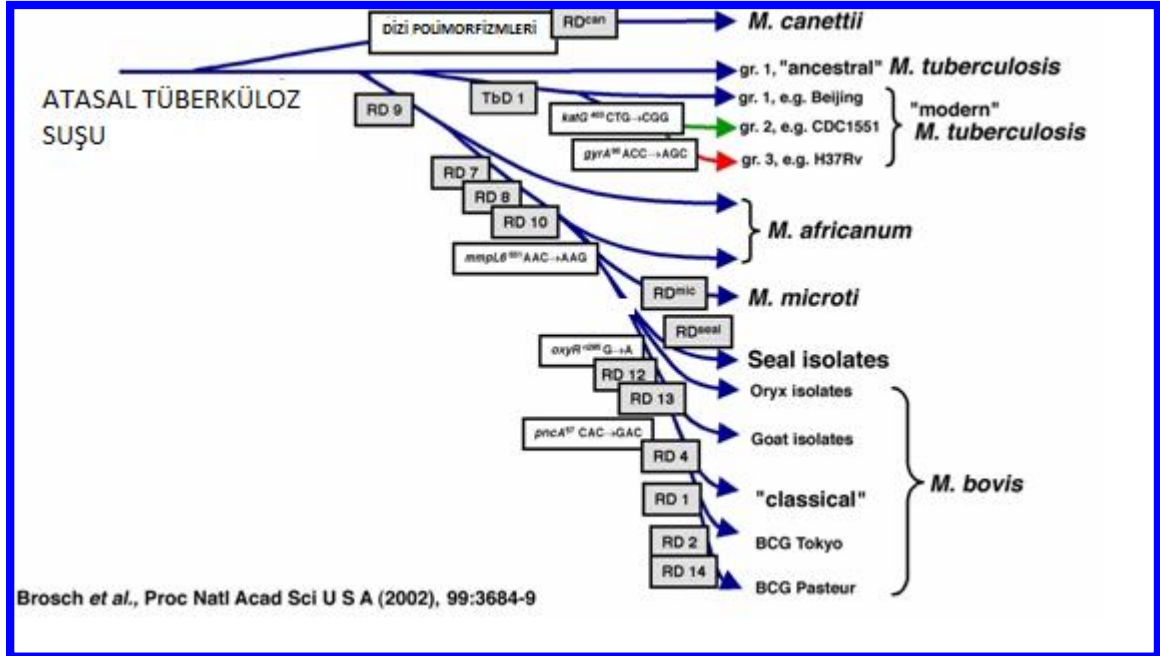
Runyon sınıflaması halen MOTT'ların ilk aşama identifikasyonunda kullanılsa da tüm mikobakterilerin gruplandırılmasında yetkili değildir. 1987'de Woods ve Washington 1979'da Wolinski'nin ilk bahsettiği klinikle uyumlu sınıflamayı önermişlerdir ³⁴.

Tablo 2. Woods ve Washington sınıflandırması ⁹

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

Mycobacteriaceae ailesinin tek cinsi olan *Mycobacterium*'lar yüksek G (guanin) + C (sitozin) : (% 61-71 mol) içeren DNA'sından dolayı diğer mikolik asit içeren *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ile birlikte *Actinomycetales* takımında sınıflandırılmıştır¹. Mikobakterilerin türler arasındaki dağılımları genomlarında yer alan 20 farklı değişken bölgedeki insersiyon ve delesyonlar ile oluşmaktadır. İnsersiyon ve delesyonları dikkate alarak yapılan çalışmalarda filogenetik ilişkileri belirlenen yaklaşık 100 farklı mikobakteri türü olduğu tespit edilmiştir.

Genetik benzerlikleri temel alınarak bu türler kompleks başlığı altında toplanmaktadır^{1,5,6}.



Şekil 4. *M. tuberculosis* kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki³⁵

mutasyonlar, bu türleri birbirinden ayırmaktadır³. *M. tuberculosis* kompleksi içerisinde yer alan *M. canettii*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* ve *M. bovis* türlerine ait gen kırılmaları incelendiğinde; *M. tuberculosis* kompleksinde meydana gelen ilk ayrışmanın 26 farklı gen bölgesindeki delesyon nedeni ile *M. canettii*'de olduğu *M. tuberculosis* kompleks türleri arasında meydana gelen bazı değişken gen bölgelerindeki gözlenmiştir. *M. tuberculosis* RD gen bölgelerini ve RD9 bölgesini koruyarak *M. africanum*, *M. microti* ve *M. bovis* türlerinden; *M. africanum* RD9 bölgesini kaybederek *M. microti* ve *M. bovis* türlerinden; *M. microti* RD9, RD7, RD8 ve RD10 bölgelerini kaybedip, RD12, RD13, RD14, RD4, RD2 ve RD1 gen bölgelerini korumasıyla *M. bovis*'den ayrılmıştır. *M. bovis* RD12, RD13 ve RD4 bölgelerini kaybederek bazı türleri enfekte etme yeteneğini kaybetmiştir. *M. bovis*'in RD1, RD2 ve RD14 gen bölgelerini kaybetmesiyle atenué BCG suşları ortaya çıkmıştır³⁶⁻³. *M. tuberculosis*'in RvD1 bölgesinin kaybıyla H37Rv, TbD1'deki ve IS6110 gibi bazı polimorfik gen bölgelerinde meydana gelen nokta mutasyonları sonucunda "Beijing",

“Haarlem”, ve “African” diye adlandırılan modern *Mycobacterium tuberculosis* kökenleri ortaya çıkmıştır^{1,3,6,7}.

2.5. Laboratuvar Tanı

Aktif tüberküloz (TB) solunum yolu örneklerinde veya diğer vücut sıvılarında *Mycobacterium tuberculosis* tespit edilerek tanı konur. Her ne kadar yeni moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiş olsa da mycobacterium tanısında, mikroskopi(ARB) ve Löwenstein-Jensen besiyerinde kültür "altın standart" olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tedavinin etkinliğini izlemek ve aktif tüberkülozun çevreye bulaşını engellemek için kısa sürede sonuç veren yöntemlere ihtiyaç vardır^{1,37}.

2.5.1. Mikroskopi

Akciğer tüberkülozunun tanısında balgamda direkt mikroskopi ile aside dirençli basilin belirlenmesi erken tanıda önemli bir rol oynar. ARB yayma mikroskopi çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere mycobacterium tanısında tek başına kullanılan yöntemdir. Balgam yayma mikroskopisi basit, hızlı ve ucuz bir tekniktir . Ancak *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ile diğer mikobakterilerin ayırımını yapamaz. Primer boyamada, Ziehl-Neelsen ve Kinyoun olmak üzere iki yöntem kullanmak mümkündür. Her iki durumda da, ARB asit-alkol ile renk giderimi sonrasında mikobakteriler mavi zeminde kırmızı basiller şeklinde görünür. Diğer bir boyama florokrom yani floresan boyama yöntemidir. Floresan mikroskopi de Auramine boya kullanılması sonucunda mikobakteriler karanlık zeminde sarı floresan veren basiller şeklinde görünür^{1,12}. Direk mikroskopi, balgamda ml de 5.000-10.000 basil varlığı durumunda aside dirençli basili tespit edebilmesinden dolayı metodunun sensitivitesi düşüktür.

2.5.2. Kültür

Mikobakterilerin izolasyonu için farklı kültür ortamları kullanılmaktadır. En sık malaşit yeşili içeren yumurtalı besiyerleri tercih edilmektedir. Sık olarak yumurta tabanlı Löwenstein-Jensen ve Ogawa besiyerleri kullanılmaktadır¹.

Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar tabanlı ve Middlebrook OADC (oleik asit-albumin-dekstroz) zenginleştirilmiş besiyerleri vardır. Bunların yanı sıra sıvı besiyeri

olan Middlebrook ADC (asit-albumin-dekstrozu) ile zenginleştirilmiş Middlebrook 7H9 tercih edilmektedir. Middlebrook besiyerleri daha yüksek izolasyon verim elde etmek için tercih edilmektedir, fakat yumurta içerikli besiyerlerinden çok daha pahalıdır¹.

BACTEC TB-460 (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi hızlı kültür sistemleri içinde yer alan yarı otomatize, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı Radyometrik Kültür Sistemidir(ysm) 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 12B (M 7H12) ve BACTEC 13A (M 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem, besiyerlerinde bulunan C¹⁴ işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan 14CO₂ in 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır³⁸.

ESP II (Extra Sensing Power), selüloz sünger ve OADC içeren M 7H9 sıvı besiyeri kullanılan tam otomatize bir sistemdir. Mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler grafiksel olarak bilgisayarda görüntülenerek değerlendirme yapılır. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur^{38,28}.

MB/Bac T, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor içeren ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Sistem kan dışındaki tüm örnekler için uygundur³⁸.

BACTEC 9000 MB, M 7H9 sıvı besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiği bir sistemdir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için "Myco/F sputa" , kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için "MycoF/lytic" besiyeri kullanılır³⁸.

BACTEC MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube), M 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon tüpler kullanılan floresan kültür sistemidir. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC ve PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresan oluşmazken; mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı floresan oluşmakta ve oluşan floresan miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Tam otomatize bir

sistem olmakla birlikte, UV ışığı altında makroskopik olarak da değerlendirme yapılabildiğinden manuel olarak kullanılmaya da uygundur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir^{37,38}.

2.5.3. Fenotipik Yöntemler

Mikobakterilerde türlerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Üreme hızları, koloni morfolojileri ve biyokimyasal testlere bakıldığında *M. tuberculosis* türleri ayırt edilebilir. Ancak *M. tuberculosis* kompleksi içinde yer alan türleri ayırt etmek için yavaş üreyen ARB basilleri üzerinde koloni morfolojileri, oksijen kullanımı, niasin birikimi, nitrat redüktaz aktivitesi, katalaz aktivitesi, üreme hızı, tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (TCH) direnci ve pirazinamidaz üretimine bakılır¹. Her zaman her vakada kesin tür tanımlanması yapılamamaktadır. 1980 lerde hücre duvarındaki mikolik asitlerin incelenmesi prensibi ile çalışan yüksek performanslı likid kromatografi ile mikobakterilerin identifikasyon metodu kullanılmaya başlanmıştır^{6,12}.

Tablo 3. *M. tuberculosis* kompleksi türlerin koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri³⁹

Test	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis BCG</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. canettii</i>
Morfoloji	R	R	R	R	R	S
Pirazimidaz	+	-	-	+	+	+
Niasin	+	-	-	+/-	+	-
Nitrat kull.	+	-	-	+/-	-	+
Üreaz	+/-	-	+	+/-	+/-	+
TCH duyarlılığı	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli
Oksijen	aerobik	Mikro aerofilik	aerobik	Mikro aerofilik	Mikro aerofilik	bilinmiyor
Piruvat kullanması	-	+	+	-	-	-

2.5.4. Genotipik Yöntemler

M. tuberculosis suşlarının birbirinden ayırt edilmesinde moleküler tiplendirme yöntemleri epidemiyolojik yönden son derece değerli bilgilere ulaşılmasını mümkün hale getirmiştir. Bilinen mikobakteri türü sayısı 1983 yılına kadar 53 iken bugün bu yöntemler sayesinde sayı 150'nin üzerine çıkmıştır. Mikobakterilerin doğru şekilde tiplendirilmeleri için kullanılacak en ideal yöntem tüm genomun dizi analizini yapmaktır. Moleküler yöntemler parmak izi "fingerprint" olarak adlandırılan spesifik genetik profilleri ortaya koyabilmelidir. İki veya daha fazla suş aynı parmak izine yani aynı genetik profile sahipse izolatların epidemiyolojik olarak ilişkili oldukları görülmektedir. Moleküler epidemiyolojik tiplendirme metodları salgın tespitinde kullanılan güçlü araçlardır^{6,12}.

Mycobacterium tuberculosis genomunun bütün baz dizilimi çıkarılmış olup homojen ve stabil yapıdadır. Genom yaklaşık 4.4 mega baz çiftinden oluşmaktadır ve oldukça yüksek oranda guanin-sitozin (%62-70) içermektedir³. Genomda çok az sayıda sessiz mutasyon meydana gelmekte, genetik rekombinasyonlar, genellikle transpozonlar yoluyla veya tekrarlayan dizilerin polimorfizmi ile gerçekleşmektedir⁶. En basit transpozon 'Insertion sequence'dir (IS). Genom üzerinde 14'den fazla farklı IS elementi belirlenmiştir. IS ve tekrarlayan diziler farklı tür, dal ve alt dallarda farklı sayıda ve genomun farklı yerlerinde yerleşirler, genetik polimorfizmin oluşumunu sağladıkları kabul edilmektedir. Bu nedenle farklı suşlar arasındaki ayırmada sıklıkla kullanılmaktadırlar Bugüne kadar çok sayıda tekrarlayan dizi ve mobil element tespit edilmiş olmasına rağmen, bugün için en çok kabul gören ve en sık kullanılan tekrarlayıcı elemanlar IS6110, DR (Direct repeat) ve MIRU'dur (Mycobacterial interspersed repetitive units)³⁹.

Mikobakterilerin tanımlanmasında 16S rRNA gen bölgesi diziliminin belirlenmesi gibi çeşitli moleküler biyolojik yöntemlerin geliştirilmesi ile konvansiyonel biyokimyasal testlerin yerini moleküler metodlar almıştır. *M. tuberculosis* kompleksinin tanımlanması 16S rRNA bölgesini hedef alan gen problemleri kullanılarak mümkün olmaktadır. Fakat bu problemler tür düzeyinde tanımlama yapamıyordu. *Mycobacterium* türlerini ve *M. tuberculosis* kompleksi tanımlayan 16S-23S rRNA bölge amplifikasyonu ve reverse hibridizasyon metodu INNO-Lipa kullanılmıştır. 23S rRNA gen bölgesini hedef alan DNA strip test Geno Type MTBC de

M. tuberculosis kompleks üyelerinin ayrımında kullanılmıştır. Bu test gyrB DNA dizi polimorfizmleri ve bovis BCG RD1 delesyonuna dayanmaktaydı. Exact Tandem Repeat D (ETR-D; Mikobakteriyel Serpiştirilmiş Tekrarlayan Ünite 4) dizilimi gösterilmiş ve bu gen gölgesinin *M. tuberculosis* kompleksinin tür düzeyinde belirlenmesini hızlı, doğru, tek adımda sağladığı görülmüştür. Behr ve arkadaşları *M. tuberculosis* H37Rv suşları ile genomik karşılaştırılma sonucu *M. bovis* BCG de bazı farklılık bölgesinin (RD1-16) olmadığını belirlemişlerdir. Huard ve arkadaşları *M. tuberculosis* kompleks içindeki türleri ayırd etmek için RD delesyon bölgesini hedef alan yedi primer çiftini ayrı, ancak eş zamanlı reaksiyonlarda kullanarak PCR bazlı tiplendirme metodu geliştirmiştir. *M. caprae* ve *M. pinnipedii* geliştirilen LSP ve tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) teknikleri sonucu *M. tuberculosis* kompleks üyesi olarak kabul edilmiştir¹².

M. tuberculosis kompleks içerisindeki DNA polimorfizmlerini tanımlamada IS6110-PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism), Spoligotyping, Variable Number of Tandem Repeat (VNTR), Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) yöntemleri ve kombinasyonları kullanılmaktadır¹⁶.

2.5.4.1 IS6110-RFLP(Restriction fragment length polymorphism)

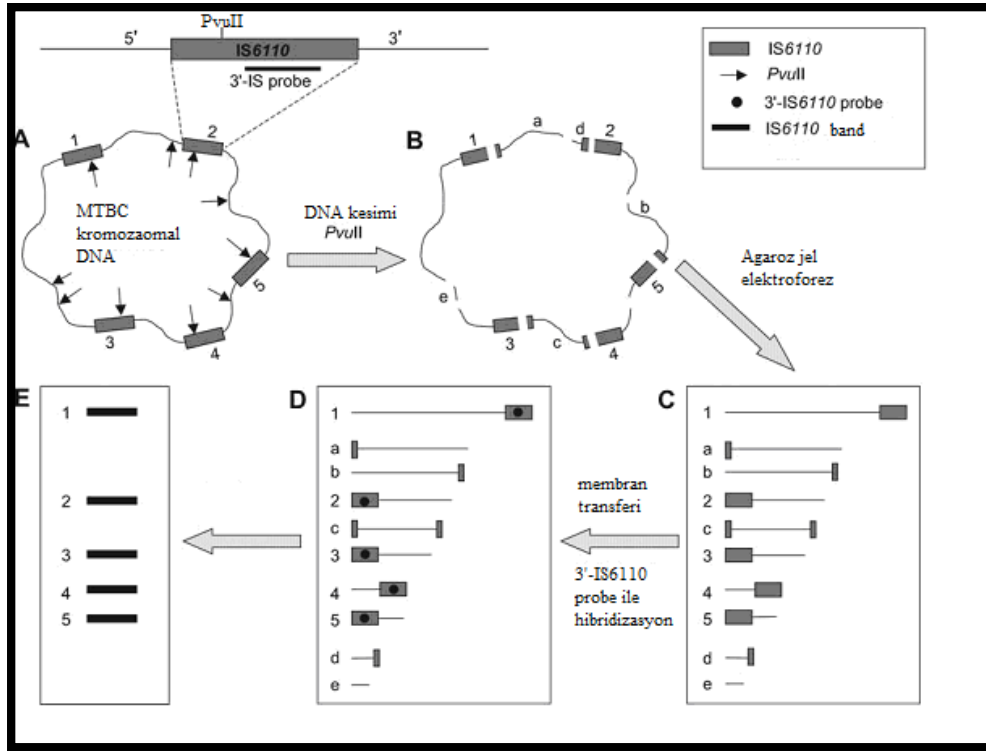
Tüberküloz moleküler epidemiyolojisinde kompleks içerisindeki suşlarda bulunan tekrarlayan dizileri hedef alan çok sayıda yöntem denenmiştir. *M. tuberculosis*'de farklı kopya sayısında tekrarlayan bu elementler; insersiyon dizileri, IS6110, IS1081 ve IS1547, major polimorfik tandem repeats (MPTRs), polimorfik GC-zengin repetitive sequences (PGRSs) ve direct repeat sequence (DR) dir.

Memeli hücreleri de dahil olmak üzere mikroorganizmaların çoğunda genomdaki bir bölgeden kendiliğinden çıkarak bir başka bölgeye yerleşebilen “Mobil Genetik Elementler” bulunur. Bu genetik elementlerin varlığı ilk kez 1960'lı yılların başlarında Barbara McClintock tarafından tanımlanmıştır. Genomun evrimine gen regülasyon potansiyelleri ile katkıda bulunan bu mobil elementler aktarılma mekanizmalarına göre sınıflandırılmışlardır. Sınıf I olarak tanımlanan mobil elementler gen içerisinde önce transkribe edildikleri RNA'ya daha sonrada DNA ya dönüşerek hareket edebilirken, sınıf II de yer alan mobil elementler, ki bunlar transposonlar olarak tanımlanırlar, transposas enzimine sahiptir. Bu yolla gen içerisinde kendi kopilerini

oluşturabilirler, genomdan kopilenmeden kesilerek çıkıp bir başka pozisyona girebilirler. Bakterilerde insersiyon segmentleri (IS) olarak tanımlanan transpozonlar her iki mekanizma ile de yani RNA yolu ile replikatif veya direkt kesilerek non replikatif yolla hareket ederler.

M.tuberculosis suşlarında transposonların varlığı ilk olarak Gordon ve arkadaşları tarafından *M. tuberculosis* H37Rv genome analizi çalışmaları sırasında tespit edilen 30 kadar transpozonun tespit edilmesi ile gösterildi. Bu segmentlerden sadece *M.tuberculosis* kompleksi türlerde görülen ve salgın araştırmalarında hedef olarak en sık kullanılan polimorfik moleküler marker olan IS6110; ilk olarak 1990'lı yılların başında tanımlandı. Genomda 1 ila 20 arasında değişen farklı kopya sayısına sahip olup genomdaki lokalizasyonu türler arasında değişim gösteren bu transpozon 1.36 kb büyüklüğünde olup terminal bölgesinde sahip olduğu 23kb uzunluğundaki noksan inverted repeat dizileri ile ilk defa enterobactereceae ailesinde tanımlanmış olan IS3 ailesi mensubudur. Diğer IS3 ailesi transpozonlar gibi IS6110 dizisinde iki tane kısmen üst üste gelen, *orfA* ve *orfB* olarak adlandırılan, açık okuma bölgesine sahiptir. OrfAB proteini bir transposase olup yer değiştirmede önemlidir.

Yer ve sayıları itibarı ile *M. tuberculosis* kompleksindeki suşlarda oldukça polimorfik olan IS6110 suşdan suşa değişkenlik göstermekle birlikte genomda sıklıkla 8-15 kopya halinde bulunur. İşte bu polimorfizm IS6110'u suşlar arasındaki atasal ilişkiyi belirlemede önemli bir stabil marker haline getirir. Bu sebeple PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) ile IS6110-parmakizi yöntemi *M. tuberculosis* epidemiyolojisinde bulaş ve reaktivasyon olaylarını tespitite "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Özellikle düşük sayıda kopya ya sahip suşlarda elde edilen sonuçlar yer değiştirme olaylarında sınırlı olacağı için son derece anlamlı olacaktır. PCR-RFLP yönteminde öncelikle kromozomal DNA'daki IS6110 bölgeleri *PvuII* enzimi ile kesilmekte, ardından gecelik elektroforez yapılarak bantların ayrışması sağlanmaktadır. Alkali ortamda denatüre edilen jeldeki DNA, southern blotting yöntemi ile naylon membrana aktarılır. DNA membrana fikse edildikten sonra IS6110 kesim bölgesinin sağ tarafı ile hibridize olan 245 baz çiftlik kemiluminesan veren maddeyle işaretli prop kullanılarak hibridizasyon yapılır⁴⁰.

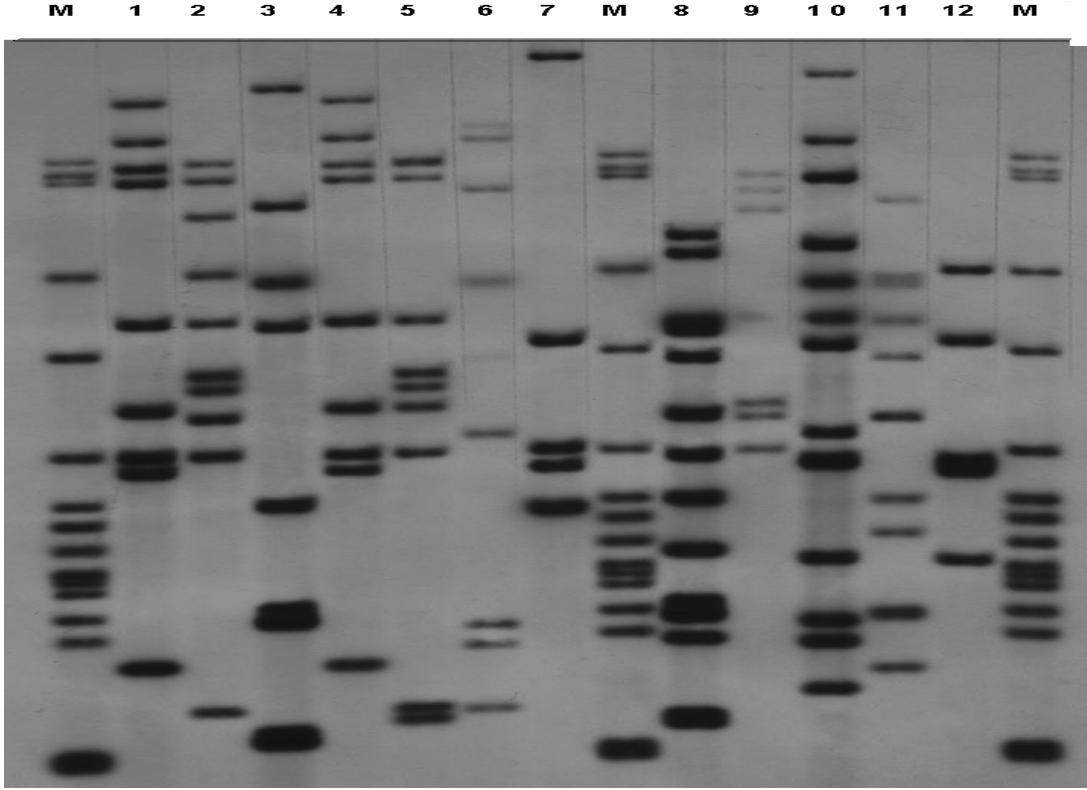


Şekil 5. IS6110-RFLP yönteminin şematik görüntüsü. (A) *M.tuberculosis* genomunda 5 IS6110 kopyası; (B) kromozomal DNA' nın *Pvu* II enzimi ile kesimi; (C) DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına ayrımı; (D) kromozomal DNA fragmentlerinde spesifik IS6110 kopyaları; (E) IS6110 bantlarının prob ile hibridizasyon sonrası görünümü.³⁹

Elde edilen ışıma x-ray film üzerine aktararak sonuçlar yorumlanır. Yüksek seviyede ayırım gücünden dolayı yeni geliştirilen PCR bazlı yöntemlerin doğrulanmasında kullanılır. Yöntemin dezavantajı sekonder kültüre gereksinim duyulması, uzun zaman alması, deneyimli personel ihtiyacı ve en önemlisi de kopya sayısı 5 ve altında olan suşlarda ayırım gücünün yetersiz kalmasıdır. Ayrıca IS6110 kopyası bulunmayan suşlarda sonuç alınamamaktadır⁴⁰.

Moleküler epidemiyoloji çalışmalarındaki temel amaç suşlar arasındaki benzerlik ile epidemiyoloji verilerini tanımlamaktır. *M.tuberculosis* izolatlarında 5 ve daha az IS6110 kopya sayısı görülmesi nadir olduğu için IS6110-RFLP' nin ayırım gücünün güvenilir olduğu kabul edilmiştir. Kozmopolitan bölgelerde suşların çeşitliliği, Çin, Güneydoğu Asya ve Avrasya gibi bazı coğrafik bölgelerde W-Beijing suşlarının (8 ve fazla kopyalı) baskın olduğu IS6110-RFLP ile ayırt edilebilir. Populasyondaki diğer suşların benzerlikleri de tespit edilebilir (e.g., Harleem strains). IS6110-RFLP spoligotyping, mırıu-vntr, SNPs gibi yöntemler ile birlikte kullanıldıklarında *M.*

tuberculosis kompleks içerisinde 6 ve daha az kopya sayısı içeren suşların ayrımı yapılabilmektedir^{41,42}.



Şekil 6. IS6110-RFLP görüntüsü

2.5.4.2 Spoligotyping

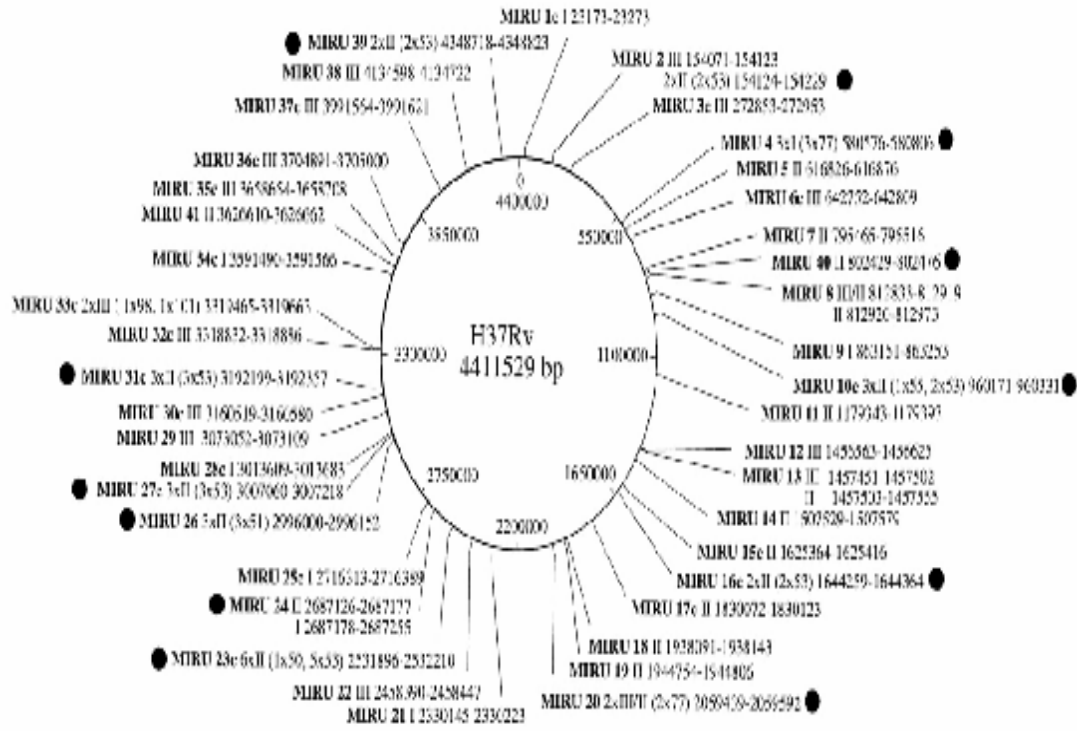
Spoligotyping yaygın kullanılan PCR bazlı reverse hibridizasyon blotlama tekniğidir, klinik laboratuvarlarda, moleküler epidemiyoloji, evrim ve populasyon genetiği araştırılmalarında kullanılır. Tüberküloz için en yaygın epidemiyolojik yöntemdir. Hızlı, basit, tekrarlanabilir bir yöntemdir, purifiye DNA ya ihtiyaç duymadan *M. tuberculosis* kompleksin ayrımını yapabilir. Bu yöntemle *M. bovis*, *M. microti* ve *M. canettii* suşları kolayca tiplendirilebilmektedir. *M. tuberculosis* kompleks genomu IS6110 integrasyonunun sıcak noktalarından olan farklı sayıda 36 baz çiftlik DR lokus içerir. DR lokusları aralarında 35-41 baz çifti uzunluğunda aralık oluşturan dizilimler (spacers) bulunmaktadır. DR'lerin kopya sayıları ve spacer dizilimlerin varlığı suşlar arası değişim gösterir. Yöntem Direct repeat (DR) lokusunun polimorfizmine dayanmaktadır, bu polimorfizmler multiple direct variable repeat' leri

(DVR) oluşturur. Her DVR, 36 baz çifti içeren DR lokusu ve DR bölgelerinin arasında bulunan tekrarlamayan kısa dizilimler olan spacer denilen bölgeleri içerir. DR lokusu hedef alınarak amplifikasyon sonrası PCR ürünü denatüre edilir. Direct repeat bölgelerinin aralarında bulunan 94 farklı spacer tanımlanmıştır, sadece 43 tanesi rutin çalışmalarda kullanılmaktadır.

DR lokusunu hedef alan biotinle işaretlenmiş primerler kullanılarak aralarındaki spacer bölgeler amplifiye edilmektedir. Amplifikasyon sonrası PCR ürünü denatüre edilir. Denatüre amplifikasyon ürünü, membrana bağlanmış olan ve farklı spacer bölgelere komplementer olan 43 farklı sentetik spacer oligonükleotidin kovalent bağlarla immobilize edildiği bir membranla hibridize edilir. Spacer dizilimlerin varlığı veya yokluğu dijital olarak gözlenmektedir. Hibridizasyon sinyalleri kemifloresan (ECF) veya kemilüminesan (ECL) kit kullanılarak membranının sabitleşme yüzeyinde leke şeklinde görülmektedir. Streptavidin alkalen fosfataz (ECF) veya Streptavidin horseradish peroksidaz (ECL) enzimi kullanılır. Streptavidin alkalen fosfataz enzimine fosfat grubu içeren substrat eklenir ve 450-470 nm dalga boyuna sahip floresan sinyalleri açığa çıkar^{12,40}. Major filogenetik lineage ataması uluslararası veritabanı olan SpolDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr>) ile gerçekleştirilmektedir.

2.5.4.3. MIRU-VNTR

Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat (MIRU-VNTR) tiplendirme yöntemi, yüksek ayırım gücü, laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği ve uluslar arası kabul görmüş standardizasyonu ile *M. tuberculosis* kompleksinin epidemiyolojik özelliklerini tespit için en hızlı yöntemdir. *M. tuberculosis* genomunda büyüklükleri 50-100 bp arasında değişen 41 farklı VNTR tanımlanmış ve bunlara MIRU adı verilmiştir. PCR bazlı tiplendirme metodudur. Hedef PCR ürününün sıralı tekrarların sayısı ve bunların her iki yanında lokalize olmuş DNA segmentlerinin büyüklüğü belirlenmektedir. Tekrarlar 52-77 oligonükleotid büyüklüğünde olup bant büyüklüklerine göre MIRU tekrarları numerik kodlama ile değerlendirilir. Suş tiplendirmede ilk olarak 12 lokus MIRU kullanımı geliştirilmiş olup daha sonra 24 lokustan oluşan standart bir format geliştirilmiştir. Klonal düzeyde tanı çalışmalarında oldukça kullanışlı olan VNTR metodu IS6110 RFLP yöntemine benzer ayırım gücüne sahiptir¹².



Şekil 7 . *M. tuberculosis* genomundaki 41 MIRU bölgesi ⁴³

3-GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2007- Haziran 2010 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 13,654 örnekten, 996'sı balgam ve 45'i bronkoalveoler lavaj ve biopsi materyali olmak üzere 1041 izolat arasından balgam ve bronkoalveoler lavaj örneklerinden izole edilen ve *M. tuberculosis* Kompleksi olarak tanımlanan, random örnekleme ile seçilen 230 izolat çalışmaya dahil edildi. İzolatlar bölgemizde görülen *M. tuberculosis* Kompleksi suşlarının tip tayini amacı ile IS6110-RFLP yöntemi kullanılarak tiplendirildi.

3.1. DNA Ekstraksiyonu

IS6110 RFLP yönteminde kullanılmak üzere seçilen 230 izolatın DNA'sının elde edilmesi için Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinden Mickle cihazını kullanarak 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 IS6110 RFLP metodu uygulandı. Ekstraksiyon protokolü aşağıda belirtildiği şekildedir.

3.1.1. 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.

3.1.2. Koloniden DNA ekstraksiyonu

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

3.2. IS6110-RFLP

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

3.2.1.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

3.2.2. Probe İşaretlenmesi

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

3.2.3. 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 5µl DNA
 - b. 3µl 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 6µl 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:
- Jel asidik buffer (0.25 M HCl) ile 15 dk çalkalayarak muamele edilir ve 2 kez distile su ile yıkanır.
 - Jel alkali buffer (0,5 M NaOH/ 1.5 M NaCl) ile 15 dk çalkalayarak muamele edilir ve 2 kez distile su ile yıkanır
 - Jel nötr buffer (3 M NaCl / 0.5 M Tris-HCl) ile 15 dk çalkalanarak muamele edilir.
 - Aparatların tamamı hazırlanır:
 - 15 × 20 cm² cam plaklar cam tepsi üzerine yerleştirilir.
 - Whatman filtre kağıtları 20 X SSC 'de nemlendirilip cam plak üzerine yerleştirilir.
 - Jel whatman filtre kağıdı üzerine yerleştirilir
 - Jelin üzerine naylon membran yerleştirilir.
 - Membran üzerine 3 veya 4 adet 6XSSC' de nemlendirilmiş whatman filtre kağıtları yerleştirilip bunların üzerine kuru filtre kağıtları yerleştirilir.
 - Membran ve filtre kağıtları üzerine 500 gr' lık ağırlık konur.
 - 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 NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) 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.

3.3. IS6110-RFLP Metodunda Kullanılacak Çözeltiler

3.3.1. 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 Agaroze 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.

3.3.2. 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.

3.3.3. 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.

3.3.4. Probe işaretleme reagentleri

Tablo 4. DIG random primed DNA işaretleme kiti (Roche diagnostics, Germany)

S. No.	Reagentler	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.

3.3.5. 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.

3.3.6. 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%)

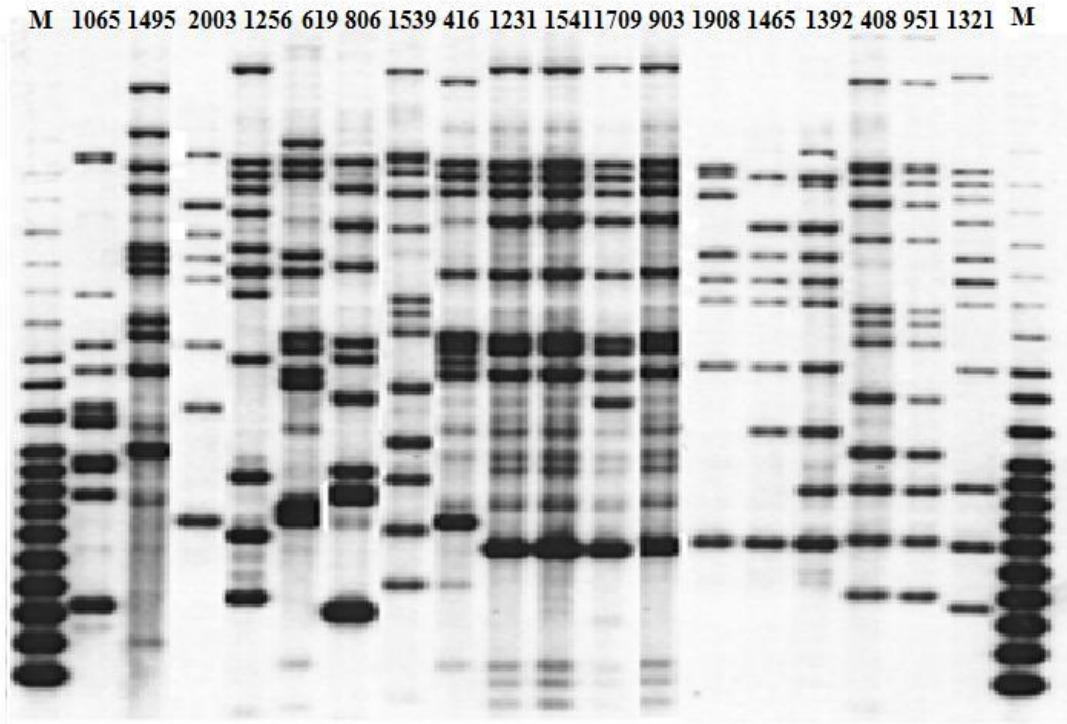
DIG blocking powder	: 10gm
DIG buffer no.1	: 100ml

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

4. BULGULAR

Çukurova bölgesinde bulunan Adana, Mersin, Antakya, Osmaniye, Gaziantep, Kahramanmaraş ve Şanlıurfa’da bulunan 1 Göğüs Hastalıkları Hastanesi ve 2 Devlet Hastanesi olmak üzere 3 yataklı hastane ile 17 Verem Savaşı Dispanserlerinden 2007-2010 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarına tanı amacı ile gönderilen akciğer tüberkülozlu hastalara ait 13,654 örnekten 996’sı balgam ve 45’i bronkoalveoler lavaj ve biopsi materyali olmak üzere 1041 örnekten izole edilen *M. tuberculosis* kompleksi olarak tanımlanan izolatlardan seçilen 230 *M. tuberculosis* komplek suşları IS6110-RFLP yöntemi ile tip tayini yapıldı. (Şekil 8).



Şekil 8 .PCR-RFLP Fragment poliformizminin görünümü

IS6110 RFLP analizi ile çalışılan 230 izolattan 146 farklı patern belirlenmiştir. Yüz yirmi örneğin bulunduğu 35 küme (%29,1), 74 özgül profil (%32,1) ve 36 benzer suş (%15,6) görülmüştür. Özgül profile sahip 12 suş tanımlanamamıştır.

Tablo 5. IS6110 kopya sayısına göre küme oranları

Kopya Sayısı	Suş Sayısı	Küme sayısı
2	20	2
3	14	5
4	17	6
5	12	2
6	15	3
7	25	5
8	34	4
9	26	3
10	22	3
11	12	1
12	19	-
13	7	-
14	7	1
2-14	230	35

İkiyüz otuz izolattan 20 suшта 2 IS6110 kopyası (%8,6), 14 suшта 3 IS6110 kopyası (%6), 17 suшта 4 IS6110 kopyası (%7,3), 12 suшта 5 IS6110 kopyası (%5,2), 15 suшта 6 IS6110 kopyası (%6,5), 25 suшта 7 IS6110 kopyası (%10,8), 34 suшта 8 IS6110 kopyası (%14,7), 26 suшта 9 IS6110 kopyası (%11,3), 22 suшта 10 IS6110 kopyası (%9,5), 12 suшта 11 IS6110 kopyası (%5,2), 19 suшта 12 IS6110 kopyası (%8,2), 7 suшта 13 IS6110 kopyası (%3), 7 suшта 14 IS6110 kopyası (%3) bulunmuştur.

IS6110 kopya sayısı 2-14 arasında değişiklik göstermektedir. Bir kopya IS6110 bulunduran ve hiç bulundurmeyan suşa rastlanmamıştır. IS6110 kopya sayısı 5 ve altında olan (düşük kopya sayılı) suş sayısı 63'dur.

Çalışmamızdaki 230 izolat içinde daha önce spoligotiplleme ile tiplendirilemeyen 24 suşdan 13 örnek, spoligotiplleme ile kombine çalışıldığında tiplendirilebilmiştir. Sonuçlara göre bu örneklerin T1, LAM7 TUR ve H3 ailelerine ait olduğu belirlenmiştir.

Tablo 6. IS6110 kopya sayısı ve SIRE sonuçları

	Suş No	Yer	Tarih	SİRE	IS6110-RFLP Kopya sayısı
1	1217	HVSD	06-2008	SSSS	3
2	913	ÇVSD	04-2008	SSSS	5
3	1539	GHH	08-2008	SRSS	10
4	1086	HVSD	07-2008	SSSS	2
5	1465	ÇVSD	07-2008	SSSS	7
6	1495	ÇVSD	07-2008	SRSS	11
7	1065	CVSD	05-2008	SRSR	9
8	1390	HVSD	04-2009	SSSS	2
9	1256	ÇVSD	06-2008	SSSS	12
10	647	HVSD	01-2010	SSSS	7
11	1541	HVSD	08-2008	SRSS	9
12	1590	CVSD	08-2008	SRSS	6
13	1392	GHH	07-2009	SRSS	8
14	57	HVSD	08-2009	SSRS	3
15	1706	HVSD	02-2010	SSSS	9
16	951	ÇVSD	05-2010	SSSS	13
17	1045	HVSD	05-2008	SRRS	5
18	2003	KVSD	06-2010	SSSS	8
19	416	Urfa	07-2007	SSSS	13
21	80	Urfa	04-2009	SRSR	6
22	619	Urfa	06-2009	SSRS	10

5. TARTIŞMA

Tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen tüberküloz, tüm dünyada HIV/AIDS'den sonra erişkinlerde en çok ölüme yol açan ikinci enfeksiyon hastalığı olarak önemini korumaktadır¹⁴. Tüberkülozla etkin bir mücadele için hızlı ve duyarlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesinin yanısıra son yirmi yılda, daha yüksek ayırım gücüne sahip moleküler epidemiyolojik yöntemlerinde geliştirilmesi araştırmacıların ilgi odağı olmuştur¹²

Moleküler tekniklerin geliştirilmesi ile enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinin anlaşılması konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir⁴³. Moleküler tiplendirme tüberkülozun; bulaş ile risk faktörleri arasındaki iliksinin açıklanmasında, dirençli suşların yayılımlarının belirlenmesinde, farklı suşlardaki virulans ve direnç mekanizmalarının aydınlatılmasında, salgınlara belirlenmesinde, filogenetik özelliklerinin ve yayılma dinamiklerinin tespitinde, reenfeksiyonun reaktivasyondan ayırımında ve laboratuvar kontaminasyonlarının gösterilmesinde son derece yararlı olmuştur⁴⁴.

Son 30 yıl içinde sosyoekonomik sorunlar, hızlı nüfus artışı, 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 kazanmıştır¹⁴. Bu nedenle mücadele için izole edilen tüm suşların moleküler epidemiyolojik bilgilerinin çıkarılması kaçınılmazdır. Bu nedenle tabıda duyarlılığın artırılması, tedavinin sağlık personeli gözetiminde tamamlanması ve *M. tuberculosis* kompleks suşlarının ülkeler ve bölgeler arası hareketlerinin izlenmesi ana ilke olarak belirlenmiştir. Tüberkülozun moleküler tiplendirilmesinde çok sayıda yöntem geliştirilmiş olmasına rağmen hiç biri tek başına yeterli ayırım gücü sağlayamamıştır. Bu sorunu ortadan kaldırmak için sistemlerin birlikte kullanılması tercih edilmiştir⁴⁴.

Biz bu çalışmada daha önceden Spoligotyping metodu uygulanan Çukurova Bölgesine ait 230 *Mycobacterium tuberculosis* izolatının suşları IS6110 RFLP yöntemi kullanarak moleküler tiplendirmesini yaptık.

Tüberküloz basilleri üzerine yapılacak olan araştırmalarda üzerinde durulması gereken hususlardan biri, izolatların anti-tüberküloz ilaçlara direnç profillerinin bilinmesidir. Genel olarak duyarlılık test sonuçları çalışılan hasta gruplarına ve kullanılan yöntemlere göre önemli değişiklikler göstermektedir. Bölgemiz izolatlarına ait direnç profili ülkemizdeki suşların direnç profilleriyle benzerlik göstermiştir.

Avrupa ülkelerindeki durumu yansıtan ve Euro TB grubu tarafından 2003 yılında yapılan çok merkezli çalışmada Batı ve Orta Avrupa’da ÇİD vaka oranı %1.7 düzeyindeyken, Baltık ülkelerinde bu oran %19.5 gibi çok yüksek değerlerde bulunmuştur. Ayrıca dikkat çekici olarak ÇİD TB görülen vakaların %80’nin Avrupa dışında doğmuş kişilerde görülmesi ve bunlar içinde de Eski Sovyet ülkesi vatandaşlarının oranının %24 olmasıdır⁴⁵.

Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2003 yılı için tahmini ÇİD-TB oranları; yeni vakalarda %2.6, tedavi almışlarda %21.8 olarak açıklanırken, dünyada en fazla ÇİD-TB görülen bölgelerin de Doğu Avrupa, Güney Doğu Asya ve Batı Pasifik olduğu açıklanmıştır¹⁹.

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

Tüberkülozla mücadelede başarılı olmuş olan ülkeler etkenin kısa sürede tespiti, etkin tedavi için elzem olan kökenlerin in vitro direnç durumunu belirleyerek olabilecek en uygun ilaç kombinasyonu ile tedavinin başlatılması ve sürdürülmesi yanında, kontrol önlemleri açısından da önemli mesafeler almışlardır. Birçok Batı Avrupa ülkesi ve Amerika Birleşik Devletleri’nde tüberkülozun epidemiyolojisi, korunma ve kontrol önlemlerine önemli katkılar sağlamakta olan moleküler tiplendirme çalışmalarına uzun süre önce başlanmış ve halen yaygın olarak yapılmaktadır. Ülkemizde de bu çalışmalara geç de olsa başlanmış, yapılan çalışmalarla ülkemizdeki kökenlerin klonal ilişkisine yönelik önemli bilgiler alınmıştır⁴⁶. Tüberküloz insidansının yüksek olduğu ülkemizde bu konuda yapılacak olan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çukurova bölgesinde bulunan 7 ilde *M. tuberculosis* klinik yakınması olanlar ile bu hastalarla yakın temas riski taşıyanlardan alınan balgam, bronkoalveoler lavaj ve ince iğne biopsi örneklerinden izole edilen ve illere göre kabul edilen örnek sayısının baz alınarak randomize seçilmiş 230 *M. tuberculosis* kompleks suşuna IS6110-RFLP analizi yapıldığı bu çalışmada 146 farklı patern elde edilmiştir. Kümeleşme oranı %29.1, özgü profil %32,1 ve benzer profil oluşturma oranı (%15,6) olarak bulunmuştur. İzolatların %27.3'sü düşük kopyalı suş, 5 kopyanın altında IS6110 bulundurmakta, olarak tanımlandı. Bu sonuçlara göre tek başına IS6110 RFLP kullanıldığı zaman çalışmada kullanılan suşların yaklaşık %29'ı tiplendirilememektedir. Çünkü IS6110 RFLP yöntemi kopya sayısı düşük olan suşlar ile IS6110 RFLP profili benzer olanlarını ayırmasını yapamamaktadır^{47,48}.

Zeytinli O.Ü. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Çukurova bölgesine ait 467 MTK suşunu Spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemi ile tiplendirmişler sonuç olarak 443 suş 21 küme içerisinde yoğunlaşmış, 24 suş hiçbir kümeye uymayan orphan izolatlar olduğunu bulmuşlar. Biz çalışmamızda 230 suşun 120 tanesini 35 küme içinde yoğunlaştığı, 12 suşun tanımlanamadığı, Zeytinli ve arkadaşlarının küme içine aldığı izolatlardan 74 suş bizim çalışmamızda herhangi bir kümeye girmeyen özgü profiller olduğu, daha önce spoligotipleme ile tiplendirilemeyen 24 suşun 12 tanesinin ise bizim çalışmamızda tiplendirilebildiği görülmüştür⁶.

Durmaz R. (2007) ve arkadaşları değerlendirdikleri 145 *M. tuberculosis* suşundan 120'sinin, üye sayıları 2-33 arasında değişen 19 kümede toplandığını ayrıca tek üyeli özel küme oluşturan 25 suş tespit ettiklerini bildirmişlerdir⁴⁰.

Kerry H. Lok ve ark. tarafından Alabama'da gerçekleştirilen araştırmada düşük kopyalı suşların oranının %41 olduğu ve bunların içinde 2 kopyalı olanların %14'ü oluşturduğu belirlenmiştir⁴⁹.

İran'da 105 suşla yapılan çalışmada düşük kopyalı suşların oranı bizim ve diğer araştırmacıların verilerine göre oldukça düşük (%8.6) bulunmuştur⁵⁰.

Heldal E. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da beş ve daha az IS6110 kopyası taşıyan suşların oranını %11.2 olarak bulmuşlardır. Norveç'te yapılan bu araştırmada Avrupa Ülkesi doğumlu olanlara göre Asya ve Afrika doğumlu olanlarda kopya sayısı yönünden anlamlı bir farklılık gözlenmiştir⁵¹.

Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda kümeleşme oranları Hollanda ve Danimarka da %50, Norveç'te %20 ve ABD'de %48 olarak belirlenmiştir^{45,52,53}. İran'da klonal ilişki bizdekine yakın olarak (%43) bulunmuştur.

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 oluşturmuşlardır⁵⁴.

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 bulunmuştur⁵⁵.

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 alınmamıştır⁵⁶.

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 oluşmuştur⁵⁷.

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 oluşturulmuştur⁵⁸.

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 diğer izolatlar 14 kopyalı bulunmuştur⁵⁹.

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 bulunmuştur⁶⁰.

Crampin(2010) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 20 yıllık bir geçmişi olan suşlar kullanılmıştır. 1996-2008 yılları arasında toplanan örnekler spoligotipleme ve

IS6110-RFLP ile kombine çalışılması sonucu suşların genotipik farklılığının yıllara göre çok fazla değişiklik göstermediği anlaşılmıştır⁶¹.

Rosales S.(2010) Ve arkadaşlarının Honduras'da yaptığı çalışmada spoligotiplleme ile 43 izolatın tiplendirilmesi yapılmıştır. Yine aynı örneklerin IS6110-RFLP yöntemiyle çalışılması sonucu 35 farklı parmak izi bulunmuş ve bu suşların 29'u özgül profil oluştururken diğer 14 izolatın 6 kümede toplandığı görülmüştür⁶².

Martin ve arkadaşlarının 2010 yılında Barcelona'da yaptığı çalışmada 69 streptomisin dirençli suşun IS6110-RFLP sonucunda 64 tanesinin ayrımı yapılabilmektedir. 45 izolat özgül profil bulunurken diğer 19 suştan 7 küme oluşmuştur⁶³.

IS6110 RFLP ve Spoligotiplleme yöntemlerini birlikte kullanarak IS6110 RFLP ile bir bant farklılığı nedeniyle benzer bulunan ve kopya sayısı 5 ve altında olan suşlar için ilave bir tiplendirme amaçlanırken, ayrıca spoligotiplleme yöntemine göre aynı profili tipler ve major spoligotip familyaları belirlenerek, bir susun filogenetik yayılımı hakkında fikir yürütülebilmektedir. Dünya'nın birçok ülkesinden yapılan çalışmalarla dünyanın her tarafında görülen ya da belirli bir coğrafik bölgeye özgü familyalar belirlenmiş ve bunlar uluslar arası veri bankasında toplanmıştır. Bu veri tabanı uluslar arası kullanıma açılarak, dünyanın neresinden olursa olsun yapılan tiplleme sonuçları bu veri bankasındakilerle kıyaslanarak, çalışılan *M. tuberculosis* izolatlarının familyaları belirlenebilmiştir^{64,65}.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bölgemizde bulunan aktif tüberkülozlu hastalardan tanı ve temas öykülü kişilerden tarama amaçlı olarak toplanarak Ç.Ü. THAUM-Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen 230 örnek *Mycobacterium tuberculosis* kompleks epidemiyolojik özelliklerini tespit amacı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda;

- a) Bölgemizdeki izolatların %27.3'ünü düşük kopyalı suşlar oluşturmaktadır.
- b) Dirençli ve duyarlı suslara özgü IS6110 profili tespit edilmedi.
- c) Çalışmamızda bir kopya ve hiç IS6110 kopyası bulundurmayan suşa rastlanmamıştır.
- d) Çoklu ilaç direncinin artışına rağmen Beijing grubunun sınırlı olduğu ve komşu illere taşınmadığı,
- e) IS6110-RFLP yöntemi ile 230 suştan 218'nin tiplendirilebildiği fakat Spoligotyping yöntemi ile kombide çalışıldığında daha yüksek ayrımın yapıldığı
- f) Bu suşların daha önce tanımlanmamış bölgesel suşlar olabilecekleri var sayılarak ileri identifikasyon için dizi analizi yöntemi ile yeniden değerlendirilmelerinin uygun olacağı
- g) Reinfeksiyonla reaktivasyonun ayırt edilerek MDR enfeksiyonun tabiatının doğru tanımlayarak gereksiz ilaç kullanımının engellenmesi yani akılcı antibiyotik kullanımının sağlanması,
- h) Yeni MDR *M.tuberculosis* suşlarının yaratılmasının engellenmesi,
- i) Bu proje çerçevesinde alt yapısı tamamlanan moleküler epidemiyolojik çalışmaların rutin olarak veya random seçilen örneklerle tekrarlanarak bölgemizdeki hareketin izlenmesinin MTK enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında son derece yararlı olacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- **Palomino JC.,Leão SC., Ritacco V.** Tuberculosis **2007**.
- 2- **Kayalı R, Çöplü N, Ceyhan ve ark.** Çok İlaça Dirençli (ÇİD) *Mycobacterium tuberculosis* Suslarının Minör ilaçlara Direncinin Saptanması. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. İzmir. **2004**: 226.
- 3- **Köksal F.** Tüberküloz basilinin kaynak ve evrim. *Tüberküloz Sempozyum kitapçığı*, Malatya. **2003**; 34-47.
- 4- **Daniel TM.** The History of Tuberculosis. Respiratory Medicine. **2006**;1862-1870.
- 5- **Çoban H.** *Mycobacterium tuberculosis*' e ait ESAT-6 VE CFP-10 proteinlerinin ekspresyonu, farklı hasta gruplarında IFN- γ VE IL-10 yanıtlarının saptanması. Uzmanlık tezi, İzmir ,**2007**.
- 6- **Zeytinli Ü.** Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spolygotyping ve MIRU-VNTR Yöntemiyle Tiplendirilmesi. Uzmanlık tezi, Adana,**2010**.
- 7- **Barış İY.** Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. *Toraks Dergisi*, **2002**; 338-340
- 8- **Barış İY.** Çağlar Boyu Tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 1-7.
- 9- **Altıntop Y.** *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarında Çeşitli Duyarlılık Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, Kayseri, **2008**.
- 10- **Karlıkaya C.** Tüberküloz Ders Notları.
<http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>. **1998**
- 11- **Bozkurt H.** Çok İlaça Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kökenlerinde Artmış İlaç Direncinin Tespiti. Uzmanlık tezi, İzmir,**2009**.
- 12- **Peterson R.** Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *Karolinska Institutet*, Sweden, **2009**.
- 13- **Santo AH.** Deaths attributed to multiple causes and involving tuberculosis in the state of Rio de Janeiro Brazil between 1999 and 2001. *J Bras Pneumol*. **2006**; 544-552.
- 14- T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı: Türkiye’de Verem Savaşı 2009 Raporu. Ankara. **2009**.
- 15- **Köksal F.** Tüberküloz Kurs Kitapçığı. Adana,**2008**.

- 16- **Günel S.** Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının IS6110RFLP (restriction fragment length polymorphism) ve spoligotyping profillerinin belirlenmesi. Doktora tezi. Malatya, **2006**.
- 17- **Kyung W, Eun J. Go Eun C, Kyung H, and Chulhun L. Chang** Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Korea by Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats. *J Korean Med Sci.* **2010**.
- 18- **Jyoti A, Urvashi S. Tanu R, Jitendra NP.** Characterization of predominant *Mycobacterium tuberculosis* strains from different subpopulations of India. *Joun. Micr.* **2009**.
- 19- **Özkara S, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H.** Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı, Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı, **2003**.
- 20- T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı: Türkiye'de Verem Savaşı 2009 Raporu. Ankara. **2007**.
- 21- **Oelemann M, Roland D. Sabine R. Camille L. Stefan N. and Philip Supply** Assessment of an Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive- Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing System Combined with Spoligotyping for Population-Based Molecular Epidemiology Studies of Tuberculosis. *Rio de Janeiro, RJ, Brasil.* **2007**.
- 22- <http://www.who.int/tb/publications/globalreport/2006/pdf/fullreportcorrectedversion.pdf>
- 23- Global Tuberculosis Control Surveillance, Planing, Financing WHO Report 2008. WHO/HTM/2008; 93.
- 24- **Zorluer E.** Yöremizde İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarında Direnç Profili. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniv Tıp Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, **2010**.
- 25- **Caroline A. Maryse F. and Philip S.** Three-Year Population-Based Evaluation of Standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *JCM.* **2009**.
- 26- **Alp, A.** Non-Moleküler Tekniklerin Tanı Amaçlı Kullanımları. IV Tüberküloz Sempozyumu Malatya, **2005**; 98-103.
- 27- **Köksal F, Yaman A.** Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu*, Samsun. **2003**; 34-47.
- 28- **Murray PR,** (editor in chief) *Manual of Clinical Microbiology* Nolte., FS, Metchock, B. sixth edition Asm Press Washington D.C. **1995**; 400- 437.
- 29- **Özışık NÇ.** Çok ilaca Dirençli Tüberküloz Hastalarında BACTEC ve Agar Proporsiyon Yöntemi İle Saptanan Etionamid Direncinin Klinik Önemi. Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul. **2006**.
- 30- www.ncbi.nlm.nih.gov

- 31- **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC.** Mycobacteria. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th Ed. Philadelphia, Lippincott; *JCM*.**1997**; 893-946
- 32- **Bariş Y.** Çağlar boyu tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu,Samsun. **2003**; 1-7
- 33- **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.
- 34- **Wayne LG, Kubica GP.** Mycobacteria In: P.H.A.Sneath, (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.*JCM***1986**; 1435-1457.
- 35- **www. PLoSPathog.org.**
- 36- **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 SoolingenD, Cole ST.** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**;3684-3689.
- 37- **Della-Latta P, Weitzman I.** Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press.**1998**: 169-183.
- 38- **Pfyffer GE, Brown-Elliot BA, Wallace RJ. Mycobacterium In: Murray PR,Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (eds). Mycobacterium. Manual Clin Microb, 8th ed. Washington DC: 2003;1156-1164.**
- 39- **Pablo Bifani , Natalia Kurepina , Barun Mathema ,Xiao-Ming Wang , and Barry Kreiswirth** Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Using IS 6110 -Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis.*BMC.* **2009**.
- 40- **Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Allix C, Dufaux MF, Rastogi N.** Population-Based Molecular Epidemiological Study of Tuberculosis in Malatya, Turkey.*Journal of Clinical Microbiology*, December **2007**; 4027-4035.
- 41- **KÖKSALAN.O** Tüberküloz Tanısında ve Moleküler Epidemiyolojik Çalışmalarda Elde Edilen Laboratuvar Sonuçlarına Yaklaşımımız Nasıl Olmalı? *ANKEM Derg* **2008**;93-96.
- 42- **Jan D. A. Van E,Donald C, Jack T, Kathleen D.Carlos M, Shinnick M,and Peter M.** Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology. *JCM.* **1993**.
- 43- **Durmaz, R.** Moleküler Epidemiyoloji Neden Gerekli, Baslarken Nelere Dikkat Edilmelidir?. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Ankara, **2004**, 52-59.
- 44- **Durmaz, R.** Tüberkülozun Epidemiyolojik Arastırmalarında Laboratuvarın Yeri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, **2003**, 443-456.
- 45- **Jan DA.** Surveillance of multi-drugresistant tuberculosis in Europe (MDR-TB surveillance) Project outline, **2006**.

- 46- **Gencer, B., Shinnick, T.M.** Molecular Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Turkey. *Am. J Infec Dis.* **2005**; 1: 5-11.
- 47- **Yang, Z., Chaves, F., Barnes ,PF., et al.** Evaluation of Method For Secondary DNA Typing *Mycobacterium Tuberculosis* With Ptb12 in Epidemiological Study of Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* **1996**;3044-3048.
- 48- **Durmaz, R.** *Mycobacterium tuberculosis* suslarının genotiplendirilmesi: IS6110 ve pTBN12 fingerprinting. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, **2001**; 181-200.
- 49- **Lok, K.H., Benjamin, W.H., Kimerling, M.E., Pruitt ,V., Lathan, M., Razeq, J., Hooper ,N., Cronin, W., and Dunlap, N.E.** Molecular Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Without IS6110 Insertions. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**;1310-1313.
- 50- **Asgharzadeh,M.; Shahbadian; K., Majidi, J., Aghazadeh, A.M., Amini; C., Jahantabi, A.R., Rafi, A.** IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from East Azerbaijan Province of Iran. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz.* **2006**;
- 51- **Heldal, E., Dahle, U.R., Sandven, P., Caugant, D.A., Brattaas, N., Waaler, H.T., Enarson, D.A., Tverdalz, A., Kongerud, J.** Risk Factors for Recent Transmission of *Mycobacterium Tuberculosis*. *J. Eur Respir.* **2003**;637–642.
- 52- **Dahle, U.R., Sandven, P., Heldal, E., and Caugant, D.A.** Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway. *J Clin Microbiol.* **2001**;1802-1807.
- 53- **Ellis, B.A., Crawford, J.T., Braden, C.R., McNabb, J.N., Moore, M., and Kammerer,** Molecular Epidemiology of Tuberculosis in a Sentinel Surveillance Population - Tuberculosis Genotyping Network. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**;1197-1208.
- 54- **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.
- 55- **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.
- 56- **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
- 57- **Jitendra, PM., Pragma, 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
- 58- **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

- 59- **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
- 60- **Watson, FM., Van den B.,Delpech, V., Drobniewski, F.,** Molecular epidemiology of tuberculosis in England, 1998 *Int Tuberculing* **2009**:201–207
- 61- **Crampin, C., Judith R., Saad, A.,** Changes in Mycobacterium tuberculosis Genotype Families Over 20 Years in a Population-Based Study in Northern Malawi *PLoS ONE* **2010**;1222
- 62- **Rosales, S.,, Lelany P., Solomon G., Nalin R., Sven EH.,** Molecular diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with tuberculosis in Honduras. *BMC* **2010**;208
- 63- **Martin, JG., Griselda, T.,Emma R.,** Characterization of mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the area of Barcelona *J Antimicrob Chemother* **2010**; 65: 2341–2346
- 64- **Zozio, T., Allix, C., Gunal, S., Saribas, Z., Alp, A., Durmaz, R., Fauville, M.-Dufaux, Rastogi, N. and Sola, C.** Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Twocities of Turkey: Description of a New Family of Genotypes That is Phylogeographically Specific for Asia Minor. *BMC Microbiology*.**2005**;1471.
- 65- **van DP,Kremer K, Mokrousov I, Narvskaia, Sola C.** *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Genetic Diversity: Mining The Fourth International Spoligotyping Database (Spolddb4) For Classification, Population Genetics And Epidemiology. *BMC.Microbiol.* **2006**;1-17.
- 66- **Santo AH.** Deaths attributed to multiple causes and involving tuberculosis in the state of Rio de Janeiro Brazil between 1999 and 2001. *J Bras Pneumol.* **2006**;544-52
- 67- **Esen N.** Tüberkülozda Mikobakteriyel Persistans Mekanizmaları. 4.Tüberküloz Sempozyumu Kitabı, Malatya, **2005**; 58-64.
- 68- **.www.rshm.gov.tr.TüberkülozdaBakteriyolojik Tanı kitabı.****2010**.

ÖZGEÇMİŞ

30.08.1986 tarihinde Adana’da doğdu. İlköğrenimini Sabancı İlkokulunda, ortaöğrenimini Meryem Abdurrahim Gizer’de, lise öğrenimini ise Ahmet Kurttepelı’de tamamladı. 2008 yılında Lisans eğitimini Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü tamamladı. 2008 yılında ise Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.