



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE
AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU HASTALARDAN İZOLE EDİLEN
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARININ
SPOLİGOTYPİNG VE MIRU-VNTR
(MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNIT-
VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEAT)
YÖNTEMİYLE TİPLENDİRİLMESİ**

Dr. Ülkü ORAL ZEYTİNLİ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr.Fatih KÖKSAL

ADANA 2010



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE
AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU HASTALARDAN İZOLE EDİLEN
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARININ
SPOLİGOTYPİNG VE MIRU-VNTR
(MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNIT-
VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEAT)
YÖNTEMİYLE TİPLENDİRİLMESİ**

Dr. Ülkü ORAL ZEYTİNLİ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr.Fatih KÖKSAL

**Bu çalışma TF2009 LTP6 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA 2010

TEŞEKKÜR

Uzmanlık 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 Yarkın'a, Prof. Dr. Akgün Yaman ve Prof. Dr. M. Macit İlkit'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmamıza destek olan İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi DETAE'den değerli hocam Dr. Orhan Kaya Köksalan'a teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım süresince her zaman yardımlarını gördüğüm bölüm sekreterimiz Suna Gökmen'e, eğitim sürem boyunca pek çok şey paylaştığım tezimin her aşamasında bana destek olan başta Yük. Lis. Öğr. Ayşe Karacalı' ya, Dr. Begüm Kayar' a ve değerli asistan, biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın her aşamasında olduğu gibi uzmanlık eğitimim süresince de hep yanımda olan sevgili anneme, babama ve hayat arkadaşım, en büyük desteğim, en iyi dostum, sevgili eşime sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
KISALTMA LİSTESİ	VII
ÖZET-ANAHTAR SÖZCÜKLER	VIII
ABSTRACT-KEYWORDS	IX
1-GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Morfoloji ve Üreme Özellikleri	6
2.2.1 Hücre Duvarı	6
2.2.1.1. Plazma Membranı	7
2.2.1.2.Orta Tabaka	7
2.2.1.3.Peptidoglikan Yapı	8
2.3. Evrim ve Sınıflandırma	9
2.3.1. <i>M. tuberculosis</i> Kompleks	12
2.3.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
2.3.1.1.1. Ana Grup I	12
2.3.1.1.1.1. Doğu Afrika-Hindistan (EAI) Alt Arubu	12
2.3.1.1.1.2. Beijing Alt Grubu	13
2.3.1.1.1.3. Orta Asya (CAS)-Delhi Alt Grubu	13
2.3.1.1.2. Ana Grup II ve III	13
2.3.1.1.2.1. Haarlem	13
2.3.1.1.2.2. Latin Amerika-Akdeniz (LAM)	14
2.3.1.1.2.3. X Alt Grubu	14
2.3.1.1.2.4. T Alt Grubu	14
2.3.1.1.2.5. MANU Alt Grubu	14
2.3.1.1.2.6. S Alt Grubu	15
2.3.1.2. <i>M. bovis</i> ve <i>M. bovis</i> BCG	15
2.3.1.3. <i>Mycobacterium africanum</i>	15
2.3.1.4. <i>M. microti</i>	16
2.3.1.5. <i>M. canettii</i>	15
2.3.1.6. <i>M. pinnipedii</i>	17
2.3.1.7. <i>M.caprae</i>	17
2.4. Virulans Faktörleri	17
2.4.1. <i>M.tuberculosis</i> ' e Ait Virulans Faktörleri	17
2.4.1.1. Hücre Duvarı Komponentleri	18
2.4.1.1.1 Mikobakteriyel Proteinler	18

2.4.1.1.1.1. Old Tüberkülin (OT)	18
2.4.1.1.1.2. Saflaştırılmış Protein Türevi (PPD)	18
2.4.1.1.1.3. Isı Şok Proteinleri HspX (65Kda, 38 Kda, 12 Kda)	19
2.4.1.1.1.4. 65 kDa Protein	19
2.4.1.1.1.5. 19 kDa Lipoprotein	19
2.4.1.1.1.6. ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target) ve CFP-10 (Culture Filtrat Protein)	19
2.4.1.1.2. Mikobakteriyel Lipidler	20
2.4.1.1.2.1. Trehaloz-6,6 Dimikolat (Kord Faktör)	20
2.4.1.1.2.2. Sülfolipidler (Sülfatidler)	20
2.4.1.1.2.3. Wax D	20
2.4.1.1.2.4. Lipoarabinomannan	20
2.4.1.1.2.5. Fosfatidil İnoзитol Mannoзid (PIM)	21
2.4.1.2. Enzimler	21
2.4.1.3. Transkrip Regülatörleri	21
2.4.2. Konağa Ait Faktörler	22
2.5. Patogenez, Patoloji ve Klinik Tablo	22
2.5.1. Klinik Tablolar	23
2.5.1.1. Primer Tüberküloз	24
2.5.1.2. Miliyer Tüberküloз	24
2.5.1.3. Sekonder Tüberküloз	25
2.5.1.3.1. Endojen Reaktivasyon	25
2.5.1.3.2. Ekzojen Reinfeksiyon	25
2.5.1.4. Ekstrapulmoner Tüberküloз	25
2.6. Konak Savunma Mekanizmaları ve İmmun Cevap	25
2.6.1. Doğal İmmun Cevap	26
2.6.1.1. Makrofajlar	26
2.6.1.2. Nötrofiller	26
2.6.1.3. Mast Hücreleri	26
2.6.1.4. Dendritik Hücreler	27
2.6.1.5. Natural Killer (NK-Doğal Öldürücü) Hücreler	27
2.6.1.6. Defensinler	27
2.6.2. Kazanılmış İmmun Cevap	27
2.6.2.1. Humoral İmmun Cevap	28
2.6.2.2. Hücresel İmmun Cevap	28
2.7. Tüberküloз Tedavisi	28
2.7.1. Birinci Seçenek İlaçlar	29
2.7.2. İkinci Seçenek İlaçlar	29
2.8. İlaç Direnci	29
2.9. Duyarlılık Testleri	30
2.10. Epidemiyoloji	30
2.11. Laboratuvar Tanı	32
2.11.1. Mikroskopi	32
2.11.2. Kültür	32
2.11.3. <i>M.tuberculosis</i> Kompleksinin Fenotipik İdentifikasyonu	33
2.11.4. <i>M.tuberculosis</i> Kompleksinin Genotipik İdentifikasyonu ve Moleküler Epidemiyoloji	33
2.11.4.1. IS6110-PCR-RFLP	35

2.11.4.2 Spoligotyping	35
2.11.4.3 MIRU-VNTR	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. DNA Ekstraksiyonu	41
3.1.1. Sıvı Besiyerinden DNA Ekstraksiyonu	41
3.1.2. Koloniden DNA Ekstraksiyonu	42
3.2. Spoligotyping	42
3.2.1. PCR	42
3.2.2. Spoligotyping Metodunda Kullanılacak Çözeltiler	43
3.2.3. PCR Ürününün Hibridizasyonu ve Görünür Hale Getirilmesi	44
3.2.4. Membranın Regenerasyonu	46
3.2.5. Yorumlama	46
3.3. MIRU-VNTR	47
4. BULGULAR	50
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
7. KAYNAKLAR	66
8. ÖZGEÇMİŞ	73

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo no</u>	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1: Woods ve Washington sınıflandırması	11
Tablo 2: <i>M. tuberculosis</i> kompleksinin Spoligotyping profilleri	36
Tablo 3: Spoligotyping sonuçlarının değerlendirilmesinde kullandığımız Oktal kod anahtarı	46
Tablo 4: 12 Lokus MIRU VNTR metodu için kullanılan primerler	48
Tablo 5: MIRU lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve ampikon boyutları	49
Tablo 6: 467 suşa ait Spoligotyping aileleri ve görülme oranları	51
Tablo 7: 467 suşa ait Spoligotyping ailelerinin 7 ilde görülme oranları	53
Tablo 8: 467 izolatın gösterdiği 23 Spoligotyping ailesinin SpolDB4 ile karşılaştırılması	54
Tablo 9: Spoligotyping T1 ailesine ait 24 izolatın 12 lokus MIRU-VNTR profili	55

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil no</u>	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1: Mikobakteriyel hücre duvarı yapısı	7
Şekil 2: <i>M. tuberculosis</i> kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki	10
Şekil 3: Türkiye de 1991-2007 yılları arasında tüberküloz insidansı	31
Şekil 4: <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ve <i>M.bovis</i> BCG suşlarının genomunda bulunan 36 bp'lik DR lokusu	37
Şekil 5: DR bölgelerinin amplifikasyon prensibi	37
Şekil 6: Spoligotyping yönteminin şematik görünümü	38
Şekil 7: <i>M. tuberculosis</i> genomundaki 41 MIRU bölgesi	40
Şekil 8: Spoligotyping görüntüsü	52
Şekil 9: MIRU-VNTR jel görüntüsü	56

KISALTMA LİSTESİ

ARB:	Asido Resistant Bacil
BCG:	Bacillus Calmette Guerin
CDC:	Center's for Disease Control
DGT:	Doğrudan Gözetim Tedavisi
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DR:	Direct Repeat
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EAI:	East African Indian
EMB:	Etambutol
ETR:	Exact Tandem Repeat
EZN:	Erlich Ziehl Nelsen
INH:	İsoniazid
LAM:	Latin American Mediterranean
LTE:	Latent Tüberküloz Enfeksiyonu
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
ST:	Shared Type
VNTR:	Variable Number of Tandem Repeat
XDR:	Extensive Drug Resistant

ÖZET

**Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen
Mycobacterium tuberculosis Suşlarının Spoligotyping ve MIRU-VNTR
(Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat)
Yöntemiyle Tiplendirilmesi**

Amaç: Tüberküloz, dünyada gelişmekte olan tüm ülkelerde görülen ve giderek önem kazanan halk sağlığı problemleri arasındadır. HIV epidemisi ile birlikte gelişmiş ülkelerde de yeniden artış trendine giren *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonlarının kontrolünde; yeni, daha hızlı, ucuz, sensitif ve spesifik tanı yöntemlerine, 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. Özellikle riskli bölgelerde tüberküloz epidemiyolojisi ile ilgili Spoligotyping ve Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU) - Variable Number Tandem Repeats (VNTR) yöntemleri gibi moleküler bazlı yöntemlerin kullanıldığı birçok araştırma yapılmasına rağmen, ülkemizde ve bölgemizde *Mycobacterium tuberculosis*'in epidemiyolojik özelliklerini tespiti yönelik çalışma yok denecek kadar azdır. Bu çalışma ile moleküler epidemiyolojik yöntemler kullanılarak *Mycobacterium tuberculosis*'in Çukurova bölgesindeki epidemiyolojik özelliklerinin tespiti amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Ocak 2007- Haziran 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 467 *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşu dahil edilmiştir. Suşlar klonal düzeyde tanı amacı ile Spoligotyping ve 12 lokus MIRU-VTR yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Spoligotyping yöntemi ile 467 izolatın 443'ünün (% 94,9) 21 küme içerisinde yoğunlaştığı, 24'ünün (% 5,1) ise SpolDB4 veri bankasındaki suşlarla karşılaştırma sonucunda bilinen hiçbir kümeye uymayan orphan suşlar oldukları belirlenmiştir. Bölgemizde en yaygın olan ailenin 239 izolat (% 51,9) ile T1 ailesi olduğu bunu 54 izolat (% 11,5) ile LAM7 TUR ailesinin izlediği görülmüştür.

Sonuç: Bu çalışma sonunda, ülkemizde yapılan 5 çalışmaya ait sonuçlardan farklı olarak bölgemizde LAM7 TUR ailesinin değil T1 ailesinin daha yaygın olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: MIRU-VNTR, *Mycobacterium tuberculosis*, Spoligotyping

ABSTRACT

Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated from Pulmonary Tuberculosis Patients by Spoligotyping and MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat) methods in Cukurova Region

Objectives: : 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. Although there are many research methods based on the use of molecular methods like Spoligotyping and Mycobacterial interspersed Repetitive Units (MIRU) - Variable Number Tandem Repeats (VNTR) especially in high risk areas, there is not enough researches for determination of epidemiological characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* in our country and our region. With this study, identification of epidemiologic features of *Mycobacterium tuberculosis* in the Cukurova Region by using molecular epidemiologic methods is aimed.

Materials and Methods: In this study, 467 *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from the clinical materials of patients that have pulmonary tuberculosis or contact suspicious which were sent our laboratory from the different hospitals and Tuberculosis Dispensary in the Cukurova Region between the dates of January 2007 to June 2010 were used. Strains were evaluated with Spoligotyping and 12 loci MIRU-VNTR methods for clonal level diagnosis.

Results: Among the 467 isolates for spoligotyping analysis, 443 (94,9 %) genotype was in 21 cluster, 24 (5,1 %) of these isolates described as orphan strains according to SpolDB4 database. Result of this study, 239 strains (51,9 %) belong to T1 genotype and 54 strains (11,5 %) belong to LAM7 TUR genotype are the most common families in our region

Conclusion: According to this study, different from the results of 5 study in our country, T1 family is more common LAM7 TUR family.

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

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTK) olarak tanımlanan bir grup mikroorganizma tarafından oluşturulan, insanlık tarihi kadar eski kronik, nekrozan bir hastalıktır¹.

Tedavi edilebilir bir hastalık olan tüberküloz, anti-tüberküloz ilaçların kullanıma girmesinin ve BCG aşı uygulamalarının başlatılmasının üzerinden yaklaşık 50 yıl geçmiş olmasına rağmen, günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, özellikle savaşlar ve iç siyasi karışıklıklar sebebi ile sağlık kontrol ve korunma yapılmaları zaafa uğramış ülkelerde yeniden önem kazanan hastalıklar arasındaki yerini korumaktadır. Halen dünya nüfusunun üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektedir. Yıllık, % 85'i gelişmekte olan 22 ülkeden olmak üzere, yaklaşık 9 milyon yeni akciğer tüberkülozu vakası bildirilmekte ve yine çoğu bu ülkelere mensup, üretkenlik dönemindeki genç yetişkinlerden olmak üzere yaklaşık olarak 2-3 milyon hasta bu global pandemide kaybedilmektedir. İnhalasyon yolu ile bulaşan *M. tuberculosis*, latent tüberküloz enfeksiyonu (LTE) olan taşıyıcılardan çok aktif tüberküloz enfeksiyonu (ATE) olan hastaların solunum yolu çıkartıları ile yayılmakta, tedavi ile kontrol edilemeyen ATE'li her hasta her yıl yaklaşık olarak 1-10 kişiyi enfekte edebilmektedir. Mevcut trendlerin devamı halinde önümüzdeki yıllarda bu rakamların artacağı, özellikle HIV ile koenfeksiyonun sık görüldüğü kötü beslenme ve düşük hayat standardına sahip gelişmekte olan ülkelerdeki morbidite ve mortalite oranlarını yükselteceği, günümüzde % 5 olan çoklu ilaç dirençli (MDR) ve genişletilmiş ilaç dirençli (XDR) *M. tuberculosis* suşlarının bu ülkelere göç yolu ile gelişmiş ülkelere yayılacağı ve oransal artış göstereceği beklenmektedir. Ancak DSÖ 2015 yılına kadar bu trendin tersine çevrilmesini hedeflemiştir².

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.

Halk sağlığı açısından büyük önem taşıyan tüberkülozun toplum içerisinde nasıl bu kadar kolay yayılabildiğini, bulaşda rol oynayan dinamikleri, endemiler ile epidemiler ve reinfeksiyon ile reaktivasyon arasındaki farkı tespit ederek açıklayacak, daha etkili kontrol tedbirlerinin geliştirilebilmesini sağlayacak, moleküler bazlı epidemiyolojik yöntemlerle izlem altına alınabilecektir.

İnsan ve Tüberküloz basilinin toplumdaki etkileşiminin tespitini amaçlayan *M. tuberculosis* ile ilgili “Moleküler Epidemiyoloji” disiplini çalışmalarına, Thierry’nin 1990’lı yıllarda mikobakteriyel insersiyon dizisi, IS6110’u RFLP yöntemi ile analiz edilerek *M.tuberculosis* izolatlarının genotipik ilişkilerini araştırması ile başlamıştır. Çok sayıda çalışmada kullanılan bu yöntem ile elde edilen polimorfizm bulguları, bir toplumda klinik örneklerden izole edilen MTK popülasyonunun genotipik karakterleri, muhtemel kaynak ve bulaş yolları, antijenik özellikleri, antibiyotik dirençleri ve coğrafi dağılımları gibi fenotipik karakterleri hakkında da klasik yöntemlere göre daha önemli ve prediktif bilgiler saęlamıřtır⁴.

Bu alışmaları, ilk kez Collins DM. ve Stephens DM. (1991) ve arkadaşları tarafından tanımlanan, van Soolingen D. (1993) ve arkadaşları tarafından IS6110’a alternatif olarak gösterilen IS1080’i , Ahmed N. ve arkadaşları tarafından (2004) gende 26 kopya halinde bulunan ve *M.tuberculosis* spesifik PE, PPE ve PE-PGRS proteinlerini kodlayan geni hedef alan PCR-RFLP bazlı yöntemler izlemiştir. Bu süre içerisinde *M. tuberculosis* kompleksi için spesifik olan gen bölgelerini hedef alan çalışmaların yanı sıra genel amaçlı kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri olan PFGE ve RAPD gibi genomdaki polimorfizmi hedef alan yöntemler izolatlar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için kullanılmıştır. Düşük ayırım gücüne sahip bu yöntemler izolatlar arasındaki klonal farklılıkları tam olarak ortaya koyamadıkları ve tür düzeyinde tanımlamada sınırlı güce sahip oldukları için moleküler epidemiyolojik çalışmalarda beklenen yararı sağlayamamışlardır. Hermans PWM. ve arkadaşları tarafından tanımlanan (1992) ve Kamerbeek J. ve arkadaşları tarafından (1997) geliştirilen, bakteri genomundaki direkt tekrar lokuslarının (DR) yerleşim yeri polimorfizmini hedef alan, PCR bazlı bir teknik olan Spoligotyping yöntemi, Burgos MV. ve arkadaşları tarafından geliştirilerek (2002) *M. tuberculosis* genomundaki kopya sayısı 10-50 arasında değişen 36 bp uzunluğundaki DR’lerin varlığı veya yokluğunu göstermek amacı ile kullanılmak üzere formüle edilmiştir. IS6110 PCR-RFLP yönteminden daha avantajlı olan bu

yöntemin, Mazars E. ve arkadaşları ile (2001) Asgharzadeh M. ve arkadaşları tarafından (2007) kullanılarak geliştirilen ve polimorfik mikro ve makrosatellitler olarak da tanımlanan *M.tuberculosis* genomunda rastgele dağılım gösteren farklı sayılarda tekrarlayan dizilerin polimorfizmini hedef alan MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat) ile kombine edilmesi halinde tek başına kullanılan tüm moleküler epidemiyolojik yöntemlerden çok daha diskriminatif sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Halk sağlığının korunması ve tüberküloz kontrol programlarının geliştirilmesi için fenotipik yöntemlerle kıyaslanmayacak büyük avantajlar sağlayan moleküler epidemiyolojik yöntemlerin geliştirilmesi çabaları sürdürülecektir. Ancak yüksek maliyet gerektiren bu yöntemler, ihtiyaç duyulan düşük ekonomik güce sahip ülkelerde kullanılamamaktadır^{5,6,7,8,9,10,11}.

Biz bu çalışmada bölgemizdeki 7 İlde hizmet veren 17 Verem Savaş Dispanseri ve 1 Göğüs Hastalıkları Hastanesi, 2 Devlet Hastanesi olmak üzere 3 yataklı hastaneden laboratuvarımıza gönderilen akciğer tüberkülozu şüpheli hastalara ait balgam ve BAL örneklerinden izole edilen *M. tuberculosis* kompleksi içerisinde yer alan 467 *M. tuberculosis* izolatının genotipik özelliklerini MIRU-VNTR ve Spoligotyping yöntemi ile araştırdık. Çalışmanın öncelikli amacı bölgemizdeki *M. tuberculosis* klinik izolatlarının genotip düzeyinde tanımlanması ve reinfeksiyonlarla reaktivasyonların tespitidir. Ancak 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.

GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Ortak bir atadan köken alan mikobakterilerin, 16S rDNA gen dizi analizi çalışmaları ve housekeeping genlerdeki sessiz-sinonim tek nükleotid (SNPs) polimorfizmi sıklığı dikkate alınarak yapılan yaş tayin çalışmaları ile en az 150 milyon yıldır evrende mevcut olduğunu, ancak yaşadıkları coğrafi çevre ve uyum sağladıkları konağın yapısına bağlı olarak bir adaptasyon süreci geçirerek 15-35 milyon yıl önce alt türlere farklılaştıkları düşünülmektedir. Mikobakterilerin atasal suşları muhtemelen günümüzde de varlıklarını koruyan, sularda serbest yaşayan mikobakterilerdir. Konak ve mikobakterilerin paralel evrimine ait hipotez 1950'li yıllarda ortaya atılan “çoklu tesadüfi giriş” in yerini alamadı ve günümüzde bazı otörlerin ısrarla iddia etmeye devam ettiği gibi “*M. tuberculosis*'in *M. bovis*'ten türediği” görüşü kabul gördü. Ancak Brosh'un 2002 yılında geliştirdiği evrim ağacı, *M. tuberculosis*' in *M. bovis*' ten farklı olarak, tahminen 15.000 yıl kadar önce sadece, TbD1 mutasyonu sonucu atasal suştan ortaya çıktığını göstermektedir. Oysa daha küçük gen yapısına sahip olan *M. bovis* çok sayıda müteakip mutasyon sonucu ortaya çıkmıştır. Günümüzdeki veriler insan tüberkülozunun Doğu Afrika'da Afrika boynuzundan ilk insanla birlikte evrimleşerek çıktığı ve buradan Afrika' ya ve dünyaya yayıldığı tezini desteklemektedir. Ancak M.Ö. 17.000' li yıllara ait bizon kemiklerinde *M. tuberculosis*' in gösterilmesi, bu bakterinin insanların dışında pleistocene (buzul) döneminde mastodonlar ve sığırları da enfekte etmiş olabileceğini gösterdi².

Paleopatolojik çalışmalar, Mısır mumyalarında *M.tuberculosis* ve *M.africanum* varlığını PCR ve HPLC ile mikolik asitlerin araştırılması yöntemi ispatlamış, yine antik çağa ait testi buluntularında Pott hastalığını işaret eden kemik deformasyonlarının resmedilmesi antik Mısır'da tüberküloz salgınlarının önemini ortaya koymuştur. Nitekim, Nil nehri vadisinde M.Ö.1500-500 ve M.Ö.500-0 yıllarında iki büyük tüberküloz epidemisi yaşandığı ileri sürülmüştür. Bu salgınlardan sonra hastalığın görülme oranı ani olarak düşmüştür. Prekolombian dönemde Amerikan yerlileri arasında tüberkülozun yaygın olduğu (M.S 500-1500)

insan ve hayvan kalıntılarının PCR ile değerlendirilmesi sonucu ortaya konmuştur. 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. Bu yıllarda Avrupa’da tüberküloz yokluk, endüstriyel bozulma, küçük yaşta çocuk çalıştırma gibi sebeplere bağlanmış, hastalar fakirlik, kötü hayat şartları ve pislikle özdeşleştirilerek toplumdan dışlanmışlardır. Her ne kadar etyolojik ajan hakkında bir fikir verilmemekle birlikte veremin bulaşıcı bir hastalık olduğu 1546 yılında Fracassaro G. tarafından “De Morbus Contagiosus” adlı kitapta bahsedilmiştir. Marten B. (1722) bu etkenlerin “muhteşem küçük canlılar” olduğu ve hastaların nefesleri ile yayılarak sağlam kişilerin vücuduna girdikleri tanımlamasını yapmıştır. Tüberkülozun bulaştırılabilir bir hastalık olduğu, deneysel olarak insandan sığırlara, sığırlardan tavşana hastalığı bulaştırarak ilk sonuçları üreten Antoine V. (1827) hastalığın anlaşılmasında devrim niteliği taşımıştır. Koch R. (1882) tüberküloz basilini patates ve agar karışımı besiyerinde üretmiş ve bu basilleri Paul E.’nin geliştirdiği boyayı modifiye ederek boyayarak gösterip, etkenin bir aside dirençli basil “ARB” olduğunu ispatlamıştır. Seibert F. 1930’lu yıllardan sonra old tüberkülini saflaştırmış ve elde edilen saflaştırılmış protein türevi (PPD) ile tüberküloz enfeksiyonunun varlığı tespit edilmeye başlanmıştır. Calmette ve Guerin isimli araştırmacılar 1921 yılında Fransa’da ilk tüberküloz aşısını yani Bacillus Calmette-Guerin (BCG)’i geliştirmişlerdir. BCG aşısı İkinci Dünya Savaşından sonra tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır^{12,13,14}.

Osmanlı İmparatorluğunda 19. yüzyılın sonlarında tüberküloz salgını büyük bir halk sağlığı sorunu olmuş, Balkan Savaşları ve 1. Dünya Savaşındaki yoğun yoksulluk koşullarında Anadolu’ya yayılmaya başlayan hastalık, 1940’ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmış ve bu dönemde en sık görülen ölüm nedeni olmuştur¹⁵.

Tüberküloz tarihinde yeni bir dönem 1940’larda ABD’de streptomisin, İsveç’te PAS’ın bulunması ile başlamıştır. Tek başına kullanılan bu ilaçlara kısa zaman içinde direnç gelişimi yeni ilaç bulma çabalarını 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) bulunmuştur¹⁶.

Bu gelişmelerin ışığında tüberküloz çalışmaları hız kazanmıştır. 1900'lü yılların başlarında endüstrileşmiş ülkelerde başlatılan tüberkülozla mücadele programları sayesinde hastalığın yayılması ve hastalığa bağlı ölümler önemli ölçüde azaltılmış ve salgın kontrol altına alınmıştır.

Ülkemizde tüberküloz ile etkin mücadele 1950'li yıllarda başlatılmıştır. Çıkartılan bir yasa ile 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur. Bu mücadele ülkemizde de hastalığın kontrol altına alınmasını sağlamıştır¹⁵.

Ancak bu çalışmaların sonuçlarına karşı duyulan aşırı güven, toplumlarda yoksulluk ve sefaletin artması, kontrolsüz göçler ve AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*-kazanılmış bağışık yetmezlik sendromu) verem hastalığını yeniden önem kazanan hastalıklar arasına taşımıştır. Tedavi seçeneklerinin sınırlı oluşu ve hasta ilaç uyumsuzluğu, ÇİD ve XDR suşların ortaya çıkışına sebep olarak pandeminin boyutları daha da büyümüştür¹⁷.

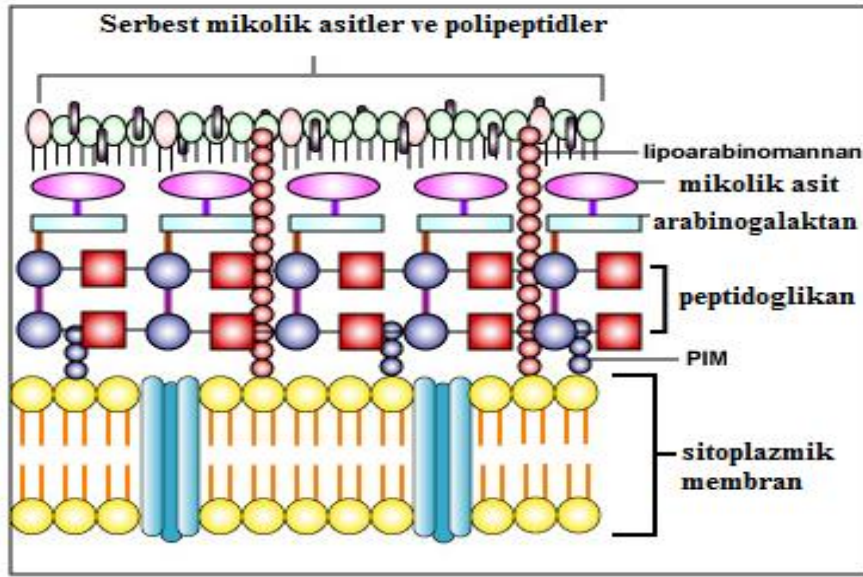
2.2. Morfoloji ve Üreme Özellikleri

Mikobakteriler aerop, sporsuz, katalaz üreten, hafif kıvrık veya düzgün çomak şeklinde, dallanabilen, 0.2- 0.6 µm eninde, 1.0-10 µm boyunda mikroorganizmalardır. Basilin büyüklüğü ve şekli, üreme ortamına ve süresine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Makrofaj içerisinde aktif çoğalan basillerin sıvı besiyerlerinde bulunan basillerden daha uzun olduğu ve tomurcuklanma benzeri yapı sergiledikleri gösterilmiştir. Patojen basillerin bölünmeden sonra hidrofobik karakterleri sebebi ile birbirlerinden ayrılmadan büyük kümeler şeklinde çoğaldıkları görülmüş, bu kümeler kord faktör (serpentine cord) olarak tanımlanmıştır. Ancak morfolojik görünüm, tür tayini veya patojenite için bir prediktif bulgu değildir.

Mikobakteriler hücre duvarlarında peptidoglikan bulunması sebebi ile Gram pozitif bakterilere benzerlerse de, boya alma yeteneklerini etkileyen son derece kompleks bir yapılanma gösteriler¹⁸.

2.2.1 Hücre Duvarı

Mikobakterilerin hücre duvarı, alışlagelmiş bakteri hücre duvarlarından oldukça farklı, plazma membranı, orta tabaka ve peptidoglikan yapı olmak üzere 3 tabakadan oluşan kompleks bir yapılanmadır ¹⁸ (Şekil 1).



Şekil 1. Mikobakteriyel hücre duvarı yapısı¹⁹

2.2.1.1. Plazma Membranı

Membran tipik olarak protein ve fosfolipidlerden oluşan çift katmanlı yapıdadır. Periplazmik boşluk sayesinde peptidoglikan tabakadan ayrılır¹⁸.

2.2.1.2.Orta Tabaka

Hücre duvarının orta tabakasında peptidoglikan, arabinogalaktan, mikolik asitler, açıl trehalozlar, oligosakkarid içeren lipidler ve fosfotidilinozitolün glikozil derivatları yer almaktadır. Bu yapılara antijenik özelliğe sahip glikoproteinler ile porin yapılar da katılmaktadır. Mikobakterilerde mikolik asitler tüm hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini, hücre lipidlerinin % 60'ını oluşturlar. Güçlü hidrofobik özelliğe sahip olan mikolik asitler alfa dallanma gösteren spesifik bir yapıya sahiptir. 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 birçok mikobakteri türünde görülen major mikolik asitler olup tüm mikolik asitlerin % 25'den fazlasını oluşturlar. Mikobakterilerin en önemli virulans faktörlerinden olan mikolik asitler hücre duvarı permeabilitesini de etkilerler¹⁸.

2.2.1.3. Peptidoglikan Yapı

Mikobakterilerde hücre duvarının en önemli karakteristiği kemotip-IV peptidoglikan yapısıdır. Klasik bakteriyel peptidoglikandan farklı olan bu yapı N-asetilglukozamin ve N-glikozilmuramik asitin, betaglikozid ve fosfodiester bağlarla bağlanmasından oluşan bir heteropolimerdir. Mikobakterilerin kemotip-IV peptidoglikan sınıfından olan peptidoglikan tabakasında diğer bakterilerin peptidoglikanlarından farklı olarak muramik asidin asetillenmiş yapısı yerine glikolik asitle glikozillenmiş formu bulunmakta ve tetrapeptid yan zincirler diaminopimelik asit içermektedir. Mikobakterilerdeki peptidoglikan tabaka kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere gram pozitif bakterilerdeki teikoik asitin bağlanmasına benzer bir disakkarit fosforil köprü ile bir heteropolisakkarit olan arabinogalakmanı kovalent olarak bağlar. Peptidoglikan yapı bakteriye şeklini verir, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır. Tetrapeptid yapıda yer alan diaminopimelik asitler ile lizozimlere karşı direnç kazanırlar¹⁸.

Hücre duvarları yapısında peptidoglikanın bulunması mikobakterilerin Gram pozitif bakterilere benzer olduğunu düşündürür. Ancak duvarda protein ve polisakkaritlerin yerini lipid tabakanın alması Gram pozitif bakterilerle farklılık yaratır. Gram'ın alkali anilin boya ile çok silik boyanan bakteri, karbol fuksin ile boyandıktan sonra asit alkol dekolizasyonunda, aside direnç sebebi ile boyayı bırakmazlar. Bu sebeple aside dirençli basil (ARB) olarak tanımlanırlar ve Ziehl-Neelsen stain (EZN) veya Kinyoun Asit Fast gibi modifiye asidik boyalarla boyanırlar. Bu boyamalarda basiller mavi zeminde kırmızı renkte görülürler. Mikobakteriler Auramin-Rodamin gibi floresan boya ile kolay boyanırlar. Bu yöntem yüksek duyarlılığı sebebi ile tanıda tercih edilir²⁰.

M. tuberculosis H37Rv genomu 4.411.529 bp büyüklüğünde olup yaklaşık olarak 4,000 gen kodlar. G-C oranı % 65,5 olup, bu yüksek oran PE ve PPE proteinlerinin kodlandığı bölge (% 80) ve transmembran proteinleri ile poliketidlerin kodlandığı bölge (% 50) hariç homojendir, bakterinin yatay gen transferi yapmadığını gösterir.

Mikobakteriler yavaş üreyen mikroorganizmalardır. Bölünme süreleri 2-20 saat arasında değişir. Middlebrook's medium gibi agar veya Lowenstein-Jensen medium gibi yumurta bazlı katı besiyerinde kolonilerin gözle görülmesi, hızlı üreyenlerde 7

günden az, yavaş üreyenlerde 7 günden daha uzun sürmektedir. Klinik örneklerden primer kültürde üreme süreleri 8 haftaya kadar uzayabilir. Bu süre sıvı besiyerlerinde daha kısadır. Üreme için gerekli optimal pH:6,5-6,8, optimal ısı 37 °C (30°C- 45°C) dir. Üreme % 10 CO₂ varlığında başlar. Ortamdaki p-nitro-D-asetilamino-β-hidroksipropiyofenon (NAP) *M. tuberculosis* kompleksin üremesini inhibe eder. Mikobakteriler canlılığını +4°C’de haftalarca, -70°C’de aylarca koruyabilir²¹.

2.3. Evrim ve Sınıflandırma

M.tuberculosis hücre duvarı mikolik asitleri benzerliği sebebi ile Actinomycetales takımı içerisinde yer alan Mycobacteriaceae ailesinin Mycobacterium cinsine ait, yavaş üreyen, aside dirençli ve % 59-65 G+C oranı ile son derece stabil genom yapısına sahip bir basildir^{22,23}.

Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Alem : Prokaryot

Bölüm: Firmicutes

Sınıf : Actinobacteria

Takım:Actinomycetales

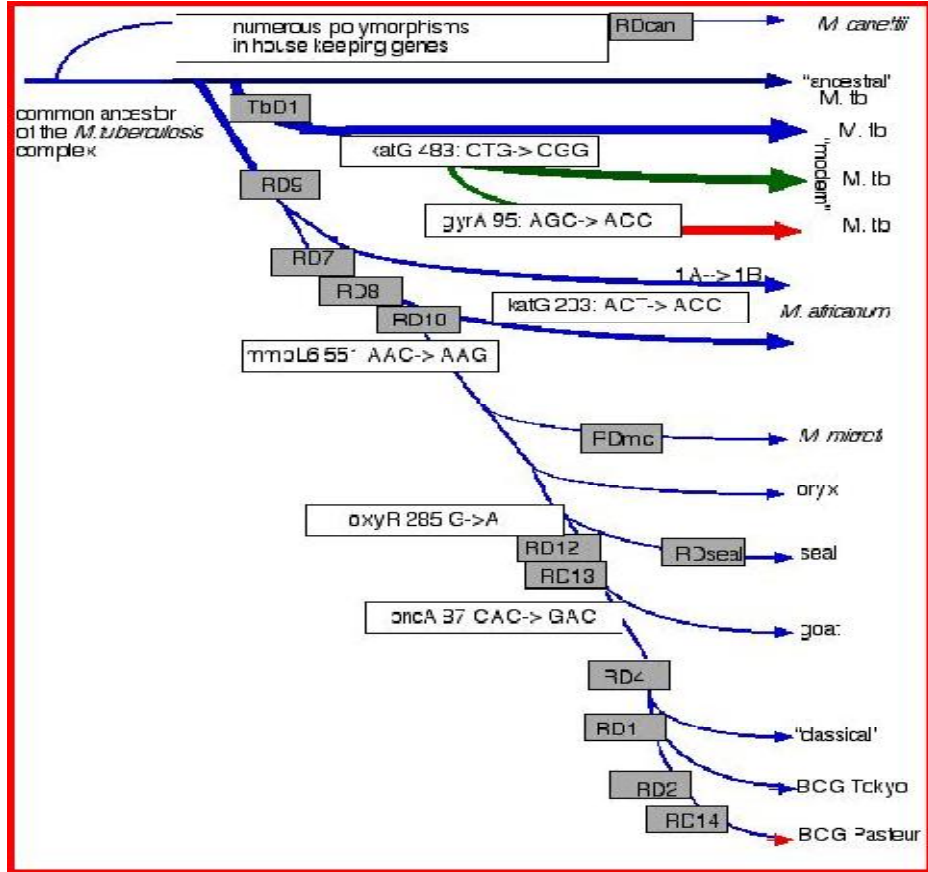
Aile : Mycobacteriaceae

Cins : Mycobacterium

Tür : *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium cinsi içerisinde evrimin ilk yıllarında meydana gelen insersiyon ve delesyon mutasyonlarına bağlı tür ve alttür özelleşmeleri meydana gelmiş, genomik düzeyde benzerlik gösteren türler farklı kompleksler içerisinde dahil edilmiştir. Klinik açıdan, hastalık yapma potansiyeli ve halk sağlığı ile yakın ilişkisi nedeni ile *M.tuberculosis* kompleksi, Mycobacterium cinsinin en önemli grubunu oluşturmaktadır. *M. tuberculosis* kompleksi olarak tanımlanan alt tür grubunda; *M. canetti*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. pinnipedii* ve *M. caprae* türleri yer almıştır. Konak tropizmlerinde, fenotipik özelliklerinde ve patojenitelerinde büyük farklılıklar olmasına karşın bu türler arasında çok yüksek düzeyde genetik homojenite bulunmaktadır. Brosh (2002) ve arkadaşları ortak atadan köken alan bu türlerin

moleküler evrimlerini mikobakterilerin genomundaki sayıları 10 olan restriksiyon ile kaybedilmiş bakteriyel artifikal gen bölgeleri yani “farklılaşma bölgeleri” (RD’s) ile tek nükleotid polimorfizmi(SNP’s)’nin belirlendiğini ileri sürmüşler ve filogenetik yapılanmayı resmetmişlerdir^{24,25} (Şekil 2).



Şekil 2: *M. tuberculosis* kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki²⁶

Kompleks içerisinde yer alan türlerden *M. tuberculosis*, *M. canettii* ve *M. africanum* insanlarda, *M. microti* kemiricilerde patojen iken, *M. caprae* ve *M. bovis* geniş bir konak spektrumu göstermektedir. Ancak kompleksin diğer üyeleri insanlarda nadiren hastalığa yol açmasından dolayı tüberküloz terimi ile *M. tuberculosis* eş anlamda kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle AIDS 'in 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 olmuştur²⁷.

Brosh ve arkadaşlarının evrime dayalı sınıflandırmalarından önce sayıları 100'ü bulan mikobakteri türünün sınıflandırılmasında iki farklı nomenklatür kullanılmıştır.

Ernest Runyon, *M. tuberculosis* dışındaki MOTT' ları üreme hızları, pigment üretimleri ve koloni morfolojilerini temel alarak fotokromojen, skotokromojen, non-fotokromojen ve hızlı üreyenler olarak dört gruba ayırmıştır. Woods ve Washington (1987) bu sınıflandırmayı eksik bularak *M. tuberculosis*'i de içerisine alan klinikle uyumlu sınıflamayı önermişlerdir^{28,29}(Tablo 1).

Tablo 1. Woods ve Washington sınıflandırması

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. 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

2.3.1. *M. tuberculosis* Kompleks

M. tuberculosis kompleksi (MTK) insan ve hayvanlarda patojen basillerden oluşur. Kompleks içinde, koloni morfolojisi, üreme hızı ve biyokimyasal testler gibi fenotipik özellikler ile DNA fingerprint teknikleri kullanılarak tanımlanan 7 üye yer almaktadır².

2.3.1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

İlk olarak Koch tarafından 1882 yılında tanımlanmıştır. İnsan tüberkülozunun en sık görülen etkenidir. İnhalasyon yoluyla yayılır. *M. tuberculosis* makrofajlar içinde yaşar, çoğalır ve yıllarca latent fazda kalabilir. *M. tuberculosis* evrim sürecinde spesifik delesyon bölgesi TbD1 delesyonu ile atasal suştan ayrılmıştır. Atasal suşa en yakın suş olan *M. canettii*'de RD ve TbD1 bölgeleri tamdır. Bu bulgular sonucunda tüberküloz basili ortak ata suşunun bir insan patojeni olduğunu göstermektedir².

Esas konağı insan olan *M. tuberculosis*, katı besiyerlerinde aerop ortamda, 37° C'de 2-4 haftada, pigmentsiz, R koloni oluşturarak ürer. Niasin biriktirir, nitratı nitrite indirger. Tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (T2H) üremeyi baskılamaz. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir. Katalaz aktivitesi düşüktür veya yoktur. Kord faktörü oluşturabilir²⁹.

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 suşlar spoligotyping tabanlı olarak 3 ana grup içerisinde değerlendirilmiştir³⁰.

2.3.1.1.1. Ana Grup I

2.3.1.1.1.1. Doğu Afrika-Hindistan (EAI) Alt Grubu

Güney Doğu Asya, Hindistan ve Doğu Afrika'da sık görülen bu alt tür ilk olarak Gine'de (1999) izole edilmiştir. EAI2-Nonhaburi, EAI6-Bangladeş/1, EAI7-Bangladeş/2, ve EAI8-Madagaskar olmak üzere 4 alt dala ayrılmıştır. EAI3 Hindistan'da, EAI4 Vietnam'da gösterilmiştir. EAI6-Bangladeş/1 izolatlarının % 58,1' i ile EAI7-Bangladeş/2 izolatların % 91,2'si Bangladeş'ten bildirilmiştir. Bu grubun en önemli özelliği bir *oxyRC37T* transisyon taşımasıdır. Az sayıda IS6110 içeren bu alt

türün tek kopya IS6110 içeren izolatlarına Malezya ve Tanzanya’da rastlanmıştır. Bu alt grupta RD farklılıklarına göre; Hint-Okyanus suşları, Manila suşları ve Nonthaburi suşları gibi farklı coğrafi bölgelerde yoğunlaşmış mutant klonları bulunmaktadır³⁰.

2.3.1.1.1.2. Beijing Alt Grubu

Beijing ve Beijing-like suşları % 50 oranında Uzak Doğu Asya’dan ve eski Sovyetler birliğinden bildirilmiştir. Bu alt grubun ortaya çıkışı, izolatlar arasında Rifampisin direnci ile karakterize ÇİD’nin yaygın oluşu sebebi ile tüberküloz kontrol programlarında çok ciddi problemlere sebep olmuştur. İlk olarak 1995 yılında tanımlanmış olan bu ÇİD New York W suşu alt grubunun 1990’ların ilk yıllarında salgınlar yaptığı gösterilmiştir. Ancak bu alt grubun evrimleşme sürecini Cengiz Han zamanından önce tamamladığı ve bu dönemde Batı Asya ve Avrupa’ya yapılan seferlerle Asya coğrafyasının dışına taşındığı düşünülmektedir³¹.

2.3.1.1.1.3. Orta Asya (CAS)-Delhi Alt Grubu

Hindistan, Pakistan, Sudan ve Sahra Altı Afrika’da epidemik olarak görülen bu alt grubun genomik özellikleri ile Beijing alt grubuna yakın olduğu ve bu alt grubun atası olabileceği söylenmiştir. Bu alt grup diğer alt gruplara kıyasla mononükleer hücrelerden daha fazla miktarda anti-inflamatuar sitokinler olan IL-10 ve IL-6 sekresyonuna, daha az IL-12p40 sekresyonuna sebep olur. Sonuç olarak makrofajların aktivitesi azalır, immun sistem yetersizliği latent enfeksiyona zemin hazırlar³⁰.

2.3.1.1.2. Ana Grup II ve III

2.3.1.1.2.1. Haarlem

İlk olarak 1999 yılında Hollanda’da tanımlanmıştır. Kuzey Avrupa ve Orta Afrika’da sık görülür. Bu alt türün suşlarının IS6110–RFLP analizinde 1,4 kb’lık çift bant görülmesi ve spoligotyping metodu sonucunda spacer 29–31 ve 33–36 bölgelerinin bulunmaması karakteristiktir. Ayrıca *mgt* geninde bu alt türe özel bir SNP tanımlanmıştır. H1’den H3’e kadar 3 farklı varyantı tespit edilmiştir. ST127 izolatlarının % 60’ından fazlası Ermenistan, Avusturya, Finlandiya, İran ve Rusya’ da gösterilmiştir. ST777 Kazakistan, Rusya, Gürcistan ve Suudi Arabistan’da

gösterilmiştir. ST777, ST 127 den tek bir spacer farklıdır. Bu izolatlar "Ural" familyası olarak tanımlanmıştır³⁰.

2.3.1.1.2.2. Latin Amerika-Akdeniz (LAM)

Ülkemiz dahil olmak üzere Akdeniz ve Latin Amerika ülkeleri ve Güney Afrika'da yaygındır. Lam1-12 arasında isimlendirilen varyantları tespit edilmiş olup LAM7 TUR ülkemizde izole edilmiştir³⁰.

2.3.1.1.2.3. X Alt Grubu

Guadeloup ve Fransız Polonez adalarında izole edilmiştir. ABD ve İngiltere'de yaygındır. Ayrıca Güney Afrika, Hindistan ve anglosakson ülkelerinde de bildirilmiştir. X1-X3 olarak tanımlanan 3 alt dalı tespit edilmiştir. Bu dal üyelerinde IS6110 sayısı nispeten azdır. Son olarak IS6110 olmayan bir üyesi Vietnamlı bir aileden izole edilmiştir. Bu izolatlar spacer19-41 (ST 405) delesyonu ile karakterize bir özel spoligotyping karakteri taşımaktadır. Sıfır kopya clade olarak isimlenmiştir³⁰.

2.3.1.1.2.4. T Alt Grubu

T familyası (modern TB suşu); tek spacer farklılığına bağlı olarak T1 den T5 e kadar 5 alt dala bölünmüştür. Spoligotyping ile 8 iç içe geçmiş dal açığa çıkarılmıştır. T3/ST149; Etiyopya ve Danimarka'da, T5/ST254 ve T1/ST280 Rusya, eski Sovyetler Birliği, Kuzey ve Doğu Avrupa'da (Estonya, Finlandiya, Gürcistan, Polonya) görülmüştür. Toskana/ST1737, ST254 ten tek spacer farklıdır, İtalya'nın Tuscany bölgesinden orijin almıştır. T3/ST627 ise ilk kez Finlandiya ve Japonya Okayama' da bulunmuştur. T5-Madrid/2 İspanya'da izole edilmiştir³⁰.

2.3.1.1.2.5. MANU Alt Grubu

Manu alt dalı Hindistan'dan yeni bir ailedir. 3 genetik gruba ayrılmıştır, atasal klon genetik grup 1 dir. Manu1'de spacer 34 delesyonu mevcuttur, Manu2'de spacer 33-34 delesyonu Manu3'de ise spacer 34-36 delesyonu mevcuttur. Hindistan'ın ve Asya'nın tüberküloz evrimsel tarihinde merkezi rolü çok belirgindir³⁰.

2.3.1.1.2.6. S Alt Grubu

S alt grubu Sicilya ve Sardinia'da belirgin olarak yüksek orandadır.

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

Sığır tüberküloz basili *M. bovis* büyük oranda yabani ve evcil hayvanlar ile insanlarda enfeksiyona yol açar. Klinik olarak *M. tuberculosis* enfeksiyonundan ayırımı oldukça zordur. İnsan nadiren de olsa primer konak olabileceği için epidemiyolojik açıdan *M. tuberculosis* ile tür düzeyinde ayırt edilmelidir. Düşük sosyoekonomik düzeyli, tüberküloz kontrol ve eliminasyon programlarının yetersiz olduğu, pastörizasyonun nadiren uygulandığı ülkelerde oldukça yaygındır. *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^{32,2}.

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 yerleştirilmiştir².

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 sı 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 göstermektedir².

Mikroaerofilik ortamda iyi ürerler. Nitratı indirgeyemezler. T2H varlığında üreyemezler. Pirazinamidaz aktiviteleri pozitifdir²⁹.

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 oluşturabilir².

Hem immunkompetan hem de immunsupresif hastalarda enfeksiyon oluşturabilir. Ehrlich Ziehl Nieelsen (EZN) boyamasında ay çöreği görüntüsü tipiktir²³.

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 dönüşebilir².

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 desteklenmektedir².

2.3.1.6. *Mycobacterium pinnipedii*

Bu mikroorganizma ilk olarak Avustralya deniz aslanları 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 göstermektedir².

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 üyesidir².

2.4. Virulans Faktörleri

Deri, genitoüriner sistem ve konjunktival sekresyonlar ile de bulaşabilen *M. tuberculosis*, primer olarak akciğer tüberkülozlu hastaların solunum yolu sekresyonlarındaki basillerin duyarlı kişilerde alveoler yüzey mukozasının üzerine inhalasyon yolu ile ulaşması sonucu akciğer tutulumu şeklinde başlar. Ancak, kemik ve merkezi sinir sistemi gibi bir çok organ sistemini tutabilen tüberküloz enfeksiyonlarının prognozunu bakteriye ait virulans faktörleri ve konağın immun cevabı arasındaki etkileşim belirler. Enfekte kişilerin % 90'ından fazlasında herhangi bir klinik belirti gelişmeksizin hayat boyu taşıyıcılığın sürmesi bu etkileşimdeki denge sayesinde olmaktadır. Ancak açlık, fizyolojik sefalet veya HIV gibi konak immun sistemini zaafa uğratabilecek sebepler dengeyi bozar ve aktif enfeksiyonu başlatır.

2.4.1. *M. tuberculosis*'e Ait Virulans Faktörleri

M. tuberculosis suşlarında virulansı yaratan hangi faktör veya faktörlerdir sorusunun henüz tatmin edici bir cevabı verilememiş, hücre duvar yapısı ve

sekresyonları, metabolik enzimler, transkripsiyal regülatörler gibi birden çok farazi faktörün virülansa katkısı olduğu düşünülmüştür. Bu faktörlerden en önemlileri aşağıda verilmiştir.

2.4.1.1. Hücre Duvarı Komponentleri

Mikobakterilerin besiyerinde veya makrofagozom içerisinde üremeleri esnasında, hücre duvarı sentezi ile ilişkili olarak sekrete ettikleri protein ve enzimlerdir. Basilin en önemli ayırıcı anatomik özelliğini verirler. Bu yapılar bölünmeye katkıları kadar virulansa olan etkileri ile de son derece dinamik bir yapı sergilerler. Hücre duvarı sentezi baskılanmış sferoblast basilin virulans yeteneği ortadan kalkar ve normal hücre duvarı sentezlenene kadar basil avirulan kalır.

M. tuberculosis' in antijenik özelliklerini de belirleyen bu yapılar konağın immun cevabını modifiye ederek immünsupresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşturma, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi konak-mikroorganizma ilişkisini düzenleyen ve *M. tuberculosis*'in hücre içi yaşamasını sağlayan fonksiyonları düzenlerler²².

2.4.1.1.1. Mikobakteriyel Proteinler

2.4.1.1.1.1. Old Tüberkülin (OT)

Tüberküloz basilinin kaynatılmış kültür ekstraktıdır. Önceleri intradermal cilt testinde kullanılmış ancak sadece mikobakteriyel proteinler içermemesi nedeniyle saflaştırılmasına gerek duyulmuştur³³.

2.4.1.1.1.2. Saflaştırılmış Protein Türevi (PPD)

İlk kez Seibert ve Glenn tarafından (1941) tanımlanmıştır. Sentetik besiyerlerinde hazırlanmış old tüberkülinin kollodyan membranlardan süzülmesi ve amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucu elde edilmiştir. Tam saflaştırılamamıştır ve diğer mikobakterilerle enfeksiyonda çapraz reaksiyon verebilir. DSÖ 0.1 ml solüsyonda 5TU (0.0001 mg PPD-S proteini) dozunda PPD bulunmasını önermektedir²¹.

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

Anoksik şartlarda üretilen şeparon benzeri proteinlerdir. Konakta Th1 cevabını indükler ve koruyucu immünite gelişmesinden ve komplikasyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir^{34,35}.

2.4.1.1.1.4. 65 kDa Protein

Konak hücre içinde çoğalan basillerden salgılandığı ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu lezyonda kazeifikasyon ve likefaksiyon oluşturduğu bulunmuştur. İmmünojenitesi yüksek olan bir ısı şok proteinidir^{20,21}.

2.4.1.1.1.5. 19 kDa Lipoprotein

M. tuberculosis'in hücre duvarında bulunur. Özellikle immüniteyle ilgili çok önemli rolleri vardır. İnterferon gama (INF γ) sentezini kodlayan genleri ve makrofajların INF γ reseptörünü inhibe eder. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-12 sentezini azaltarak T lenfosit aktivasyonunu inhibe eder. Nitrojen ara ürünlerinin üretimini, MHC-I'in antijen bağlamasını inhibe eder. Monosit ve makrofajların apoptozunda görevlidir³⁶.

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

M. tuberculosis'in RD1 gen lokusundan kodlanmaktadır ve bu proteinlere karşı oluşan interferon cevabını T hücre sayısını göstererek in vitro ölçen kitler geliştirilmiştir. Bu yöntem yardımıyla aktif ve latent tüberküloz tanısı konabilmekte, tedaviye yanıt takip edilebilmekte ve *M. tuberculosis* enfeksiyonunun BCG aşılmasıyla ayrımı yapılabilmektedir. Bu temel protein ve enzimlerin dışında; besiyerlerinde üreme esnasında tespit edilen üretim mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olup sayıları 200 kadar kültür filtrat proteinleri, Glutamin sentaz, yüzeyde yer alan ve muhtemelen konak hücre içerisinde üreme ile ilişkisi olan Erp proteini, mikobakteriyel mikoserosik asit sentezinde rol alan Mas proteini, bir Co-enzimA sentetaz olup yağ asidi metabolizmasına katkıda bulunan FadD26 ve Fad28 proteinleri, bir mikolil transferaz olan FbpA proteini, porin benzeri bir protein olan OmpA proteini bu grupta sayılabilecek protein duvar yapı elemanlarından bazılarıdır³⁷.

Mikobakteri, stafilokok, streptokok ve listerya cinslerinde SecA proteininin SecA1 ve SecA2 gibi farklı varyasyonları bulunur. SecA2 gen bölgesinden yoksun hale getirilen tüberküloz suşlarının virulanslarını yitirdikleri ancak in vitro kültür ortamlarında çoğalmalarında bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir³⁸.

2.4.1.1.2. Mikobakteriyel Lipidler

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

Tüberküloz basilinin küme oluşturmaya neden olur. Adjuvan etkiye sahiptir ve komplemanı alternatif yolla aktive eder. Önemli bir virulans faktörüdür. Granülom oluşumunda rol oynar. PNL göçünü inhibe eder. Konak hücre mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasar yapar^{21,33}.

2.4.1.1.2.2. Sülfolipidler (Sülfatidler)

Sülfür içeren glikolipidlerdir. Kord faktöre sinerjik etki yapar ve makrofaj içinde fagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek, basili lizozomal enzimlerin etkisinden koruduğu dolayısıyla makrofajlara karşı direnci arttırdığı gösterilmiştir²¹.

2.4.1.1.2.3. Wax D

Peptidoglikolipid yapısındadır. Freud adjuvanının etkisini artırıcı özelliğe sahiptir. Tümör geriletici özelliğe sahip olup, BCG aşısının bazı tümörlerde gerilemeye neden olan immünoterapötik etkisinde rolü vardır²¹.

2.4.1.1.2.4. Lipoarabinomannan

M. tuberculosis' in major hücre duvarı lipoglikanı olup üç tipi tespit edilmiştir. ManLAM (arabinan terminaline mannoz bağlı), fosfomyoinozitol bağlı LAM ve AraLAM (arabinan terminaline mannoz bağlı olmayan). ManLAM virulan mikobakterilerde diğerleri hızlı üreyen avirulan mikobakterilerde bulunur. ManLAM, monositleri inaktive edici ve lenfositleri baskılayıcı bir sitokin olan TGF- β 'nın ekspresyonunu indükler ve monositleri inaktive edici TNF- α 'nın daha az üretilmesine neden olur. Ayrıca manLAM'ın insan periferik kan T hücre kemotaksisini indüklediğine

dair çalışmalar, granülatöz yanıtın başlamasında manLAM'ın rolü olabileceğini düşündürmektedir^{33,39,40}.

2.4.1.1.2.5. Fosfatidil İnozitol Mannozyd (PIM)

Lipid yapısındadır. Hapten özelliği gösterir. Çapraz koruyucu immünitede rolünün olabileceği düşünülmektedir²¹.

2.4.1.2. Enzimler

M.tuberculosis, enfeksiyon ve çoğalma sürecinde metabolizması için ihtiyaç 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 transferazlardır³⁸.

2.4.1.3. Transkrip Regülatörleri

Genlerin transkripsiyonunu regüle eden regülatörler, metabolizma, hücre duvarı sentezi, bölünme ve virulans faktörlerinin ekspresyonunu düzenleyerek mikroorganizmanın bulunduğu ortama uyumunu sağlarlar. Bir çok patojende olduğu gibi mikobakterilerde de görülen ve radikal değişimleri düzenleyen regülatörler taktik düzenleyicilerdir. Bu regülatörlerden, 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, ki bu regülatör ekspresyonunun makrofaj içerisinde artışı mRNA seviyesi artışı ile gösterilmiştir ve oksidatif strese cevap olarak ekspresyonu

artan sigma H gibi sigma faktörler ile virulans genlerinin ekspresyonunu düzenleyen ve makrofaj içerisinde çoğalma ile ilgili olarak düzenlenen cevap regülatörleri ve diğer transkripsiyonel regülatörlerin virulans ile ilişkili oldukları yine mutasyon ve atenuasyon bazlı çalışmalarla gösterilmiştir⁴¹.

2.4.2. Konağa Ait Faktörler

Yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden birçok bulaşıcı hastalıkta olduğu gibi akciğer tüberkülozunda da kime hastalık bulaşacağı ve kimin hasta olacağı, hastalığın prognozunu etkileyen çevre şartları dışında insana ait genetik yatkınlığın varlığı ilk yıllardan beri sorgulanmıştır. İnsanda verem hastalığına duyarlılığı arttıran genlerin tespitine yönelik çalışmalar 1980’li yıllardan sonra artmış, ancak sonuçta tatmin edici bir çalışma grubu oluşturulamamış ve hastalığın mikrobik bir hastalık olduğu ancak konağa ait bazı gen polimorfizminin immun cevabın modifikasyonuna ve dolayısı ile immunopatogeneze katkı sağladığı kanaatine varılmıştır. *M. tuberculosis* pek çok virulans özelliği ile zaman zaman konağın bağışıklık sisteminden kurtulabilen bir enfeksiyon etkenidir. Enfeksiyonun nasıl sonuçlanacağı, konak savunması, enfekte hastaların solunum yolu sekresyonlarının duyarlı kişilerde mekanizmaları ve basilin virulans faktörlerinin etkileşimiyle belirlenir⁴¹.

2.5. Patogenez, Patoloji ve Klinik Tablo

Akciğer tüberkülozunda inhalasyon yolu ile alınan basil alveollerde nötrofiller, makrofajlar, mast hücreleri, tip II pnömositlerin ve dentritik hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere tutunarak kolonize olurlar^{42,43}.

Alveoler epitel hücre üzerinde ortamdaki kompleman veya spesifik antikorlar gibi opsonize edici proteinler tarafından işaretlenen basil fagositik hücreler tarafından fagosit edilir ve fagolizozomal füzyon içerisinde sindirilerek yok edilir. Ancak tüberküloz basilinin, opsonize edebilecek proteinler yerine farklı işlevleri olan proteinlerle birleşmesi sonucu immun sistem mediatörleri tarafından yanlış veya yetersiz algılanması sonucu veya opsonizasyona rağmen fagositik hücrelerin çeşitli genetik faktörlerin etkisi altında yetersizliği veya basil mediatörleri tarafından fagolizozomal faaliyetlerinin modifiye edilmesi sonucu basil yok edilemez ve fagositik hücre içerisinde çoğalmaya devam eder. *M. tuberculosis*’ in fagositozdan kaçış ve

fagolizozomal füzyonun engellenmesinde etkili olan mediatörleri yoğun olarak çalışılmıştır. *M. tuberculosis* tarafından sentezlenen süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri endozom içerisindeki reaktif oksijen radikallerinin etkisinden korunmasını sağlar. Yine basile ait sülfatidler, LAM ve fenolik glikolipid-I (PGL-I) oksijen radikallerinden korunmada önemlidir. Basilin endozom membranlarında fosfatidil inozitol 3 fosfat (PI-3~P) ve sfingozin 1 fosfat (S-1~P)'ın toplanmasını engelleyerek erken endozomun geç endozoma dönüşmesini ve fagozom içerisine Ca girişini düzenleyen sinyal sistemini oluşumunu önlediği gösterilmiştir. Yine ökaryotik hücrelerdeki serin/treonin kinaz benzeri bir protein olan *M. tuberculosis* kinaz G'nin ve Mikobakteriyel sülfatidler ve çoklu açılmış trehaloz 2-sülfat derivelerinin, fagozom ile lizozomun birleşmesini önlediği tespit edilmiştir^{41,44,45,46,47,48,49,50}.

Fagositik hücrede endozomlarda çoğalmaya devam eden basiller, ESAT-6 ve CFP-10 ile oluşturdukları kararlı kompleksi, membrandaki lipid bariyerlere saplayarak por formasyonu oluşturup hücrelerin lizisine sebep olurlar. Por formasyonu sonucu parçalanan hücreden alveoler boşluğa düşer, bazen de fagositik hücre endozomu içerisinde latent fazda çoğalmadan yaşamaya devam eder. Latent dönemin oluşması ve süresi sigma faktörler, izositrat liyaz ve mikolik asitler tarafından belirlenir. Parçalanan fagositik hücrelerin sekrete ettiği kemotaktik faktörler, monositlerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin infeksiyon bölgesine gelmesini sağlar ve granülom oluşumu başlar. Alveoler boşluğa geçen basiller, yeni makrofajlarca fagosite edilseler bile makrofajlar henüz aktive edilmedikleri için çoğalmaya devam ederler. Lenfohematojen yolla tüm vücuda yayılır ve yeni granülomlar oluşturur^{51,52,3,53,54,39}.

2.5.1. Klinik Tablolar

Dünyada en çok karşılaşılan *M. tuberculosis* enfeksiyonu akciğer tüberkülozudur. Bakteri hastanın öksürmesi ve aksırması sonucu 5 µm çapındaki damlacıklar içinde dışarı çıkar. Bu damlacıklar içerisindeki basiller birkaç saat asılı halde havada dolaşırlar. Duyarlı bir kişi tarafından solunum yolu ile alınan enfekte damlacıklar akciğer alveollerine ulaşır. Her lokalizasyon hastalıkla sonlanmaz, enfekte olan kişilerin ancak % 5-10' unda hastalık ortaya çıkar. Kolonize kişilerin büyük bir kısmında hastalık hiç gelişmez. Mikroorganizma vücut içinde uzun bir zaman dormant (aktif olmayan) halde kalabilir. Tek belirti kişinin PPD (tüberkülin)'sinin pozitif

olmasıdır. Böyle kişiler hayatlarının geri kalan kısmında hastalık riski taşıyarak yaşarlar. Basilin aktif olarak çoğaldığı hastalarda klinik tablo farklı şekillerde ortaya çıkabilir⁵⁵.

2.5.1.1. Primer Tüberküloz

M. tuberculosis ile daha önceden karşılaşmamış veya BCG ile aşılanmamış PPD negatif bireyde inhalasyon yolu ile basilin alınmasından 2-6 hafta sonra etkene karşı spesifik hücresel cevap gelişir. Lezyon bölgesinde çoğalan basillerin tüberkülin benzeri proteinleri, doku hasarı yapan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna yol açar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu tüberkülin testi pozitifliğine ve kazeifikasyon, likeifikasyon, kavitasyon ile karakterize granüloma sebep olur. Bu aşamadan sonra hastalık iki farklı şekilde devam eder. Makrofajlar inaktive edilerek içindeki basillerin çoğalması durdurulur ve granülom merkezinde basillerin daha fazla çoğalmadan yaşam boyu dormant kaldığı kazeöz nekroz alanları oluşturulur. Kazeöz odağın etrafında toplanan aktif makrofajlar, kazeöz odaklardan kaçan basilleri fagosite ederek hızla sindirirler. Primer infeksiyon ve primer odağın (Ghon odağı) olduğu bu evrede tüberkülin testi pozitifleşir. Bu dönemin nasıl ilerleyeceği, bakterinin virulansı ve konağın immün durumu arasındaki dengeye bağlıdır. Ancak, immün cevabı baskılanmış kişilerde kazeöz odaklardan kaçan basiller, inaktif ya da düşük aktivitedeki makrofajlar tarafından fagosite edilir, fakat sindirilemezler. Bu makrofajların yakaladığı basiller çoğalmayı sürdürürse, çoğalmanın durdurulabilmesi için gecikmiş tip aşırı duyarlılık cevabının tekrarlanması gerekir. Bu cevap tekrarlandıkça kazeöz nekrozlar genişler ve primer tüberküloz oluşur. Basiller, pulmoner ven duvarında oluşan kazeöz odağın açılması ile lenfohematojen yolla akciğerden vücudun diğer bölümlerine yayılır ve miliyer ve dissemine tüberküloz gelişir^{56,39,3,40}.

2.5.1.2. Miliyer Tüberküloz

Kazeöz odağın komşu kan damarlarına açılması veya damar duvarındaki tüberkülin kazeifiye olarak dolaşıma bol miktarda basil vermesi, özellikle 0-4 yaş arası immün sistemi zayıf çocuklarda miliyer tüberküloz gelişimine yol açar. Yetişkinlerde ise eski bir tüberküloz lezyonunun yeniden alevlenmesi ve kan damarlarında erozyon

oluşumu veya tüberküloz lezyonu içeren bir organda yapılan cerrahi işlemle basiller kana karışabilir ve böylece miliyer tüberküloz gelişebilir⁵⁶.

2.5.1.3. Sekonder Tüberküloz

Primer enfeksiyon geçiren ve tüberkülin deri testi pozitifleşen kişilerde primer enfeksiyondan en az beş yıl sonra gelişen tüberkülozdur. İki şekilde gelişebilir:

2.5.1.3.1. Endojen Reaktivasyon

Primer enfeksiyondan sonra dokularda dormant kalan basillerin, stres, steroid tedavisi, kanser kemoterapisi veya HIV enfeksiyonu gibi hücrel immün yanıtın baskılandığı durumda aktif hale geçmesiyle oluşur³².

2.5.1.3.2. Ekzojen Reinfeksiyon

Daha önce primer enfeksiyon geçirmiş, PPD'si pozitif bireylerin tüberküloz basiliyle tekrar maruziyeti sonucu hücrel immünite basillerin alvollere yerleşmesini, çoğalmasını kısmen önler fakat bu koruma tam değildir. Hücrel immüitenin zayıfladığı durumlarda basiller tekrar çoğalmaya başlar⁵⁶.

2.5.1.4. Ekstrapulmoner Tüberküloz

Tüberküloz akciğer dışında plevra, perikard, peritona komşuluk yoluyla; kemik, eklem, böbrek, genital, gastrointestinal, merkezi sinir sistemine hematogen yolla yayılabilir. Deri tüberkülozu direkt temasla oluşabilir²³.

2.6. Konak Savunma Mekanizmaları ve İmmun Cevap

Konak savunması, bağışıklık sistemi elemanlarının farklı işlevleri ile sağlanır. Reseptörlerin uyarılması sonucu oluşan cevaplar, gereken zamanda ve gereken düzeyde verilmelidir. İmmun cevabın elemanları çok farklı roller üstlenebilirler. Gereken yanıtın ortaya çıkmasına veya durdurulmasına katkı sağlayabilirler. Konağa ait genetik bozukluklar ya da patojene ait virulans faktörleri, immün toleransa veya immün cevaba, cevap dengesizliklerine ve nihayet immunopatogeneze kadar gidebilir⁵⁷.

2.6.1. Doğal İmmun Cevap

M. tuberculosis'e karşı doğal immunitede doku makrofajlarının yanı sıra nötrofiller, mast hücreleri ve dentritik hücrelerinde etkili oldukları gösterilmiştir.

2.6.1.1. Makrofajlar

Tüberküloz basilini yok eden ve etkin bir bağışık yanıt gelişimini sağlayan en önemli hücrelerdir. Makrofajların tüberküloz basili ile etkileşimleri farklı reseptörleri sayesinde gerçekleşmektedir. Makrofaj reseptörlerinin en önemlileri Fc, kompleman, mannoz, sürfaktan, CD14, CD43, TLR-2 ve TLR-4 reseptörleridir. Farklı reseptörlerin uyarılması birbirine benzemeyen etkiler oluşturabildiği için, bazıları enfeksiyonun üstesinden gelinmesinde dezavantaj olabilmektedir. Nitrojen ve oksijen radikalleri ve yardımcı T lenfositlerin desteği sayesinde öldürme yeteneği artan makrofajlar, konağın tüberküloz basilini yok etmesinde en önemli görevi üstlenen hücrelerdir^{58,59,60}.

2.6.1.2.Nötrofiller

Zararlı bir etkenle temas sonrası sekrete edilen kemokinlere ilk cevap veren hücrelerdendir. *M. tuberculosis*'in ortadan kaldırılmasında genellikle yetersiz kalsalar da fagositoz aktiviteleri, oksijene bağımlı öldürme mekanizmaları veya hücre dışı degranülasyon ürünleri ile konak bağışıklık sistemine katkı sağlarlar⁵⁷.

2.6.1.3. Mast Hücreleri

Genellikle allerjik reaksiyonlara neden olur. T-helper 2 hücre yanıtının ortaya çıkmasını sağlarlar. Solunum, gastrointestinal ve üriner sistem mukozaları ile kan ve lenf damarlarının yakın çevresinde yerleşirler. Yüksek afiniteli IgE reseptörleri (FcεRI) taşımaktadırlar. Bu reseptörlerle IgE tipindeki antikorlara bağlanırlar. Mast hücreleri CD48 yüzey molekülleri ile TLR-4, TLR-2 gibi PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern)'leri sayesinde *M. tuberculosis* ile etkileşerek histamin, triptaz, kimaz, karboksipeptidaz, heparin, LT-C4, PGD2, PAF, TNF-α, TGF-β, IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-8 gibi kemoatraktan moleküller, kemokinler ve sitokinleri salgılayarak inflamatuvar yanıtı katkı sağlarlar⁶¹.

2.6.1.4. Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler edinilmiş bağışıklığın geliştirilmesinde büyük rol oynarlar. C-tipi lektin, Fc γ ve Fc ϵ reseptörlerini kullanarak reseptör bağımlı endositoz yoluyla hücre içine aldıkları *M. tuberculosis*'e ait antijenik yapıları işlemleyerek maturasyonlarını tamamlarlar. CCR7 kemokin reseptörleri ile en yakın lenf noduna doğru göç ederler. İşlemledikleri antijenleri, MHC-I, MHC-II ve CD1 molekülleri ile T lenfositlere sunarlar^{62,63}.

2.6.1.5. Natural Killer (NK- Doğal Öldürücü) Hücreler

Hedefledikleri hücreleri sitotoksik etkinlikleriyle öldürebilmektedirler. Yalnızca viral patojenler ve tümör hücrelerine karşı doğal bağışık yanıt işlevi gördüğü düşünülen NK hücrelerinin bakteriyel enfeksiyonlara karşı da çok önemli işlevlerinin olduğu anlaşılmıştır. Patojenlere karşı en erken IFN- γ yanıtı veren hücrelerdir. *M. tuberculosis* ile enfekte makrofajların, aktive olmalarını ve enfekte hücrelerin ölmelerini sağlarlar^{64,65}.

2.6.1.6. Defensinler

Defensinler 30-50 aminoasit uzunlukta, antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkinlikleri olan peptidlerdir. Bu katyonik peptitler tüm myeloid ve epitelyal hücreler tarafından sentezlenebilmektedirler. Defensinlerle fagositer hücrelerin içerisindeki mikroorganizmalar oksijenden bağımsız olarak hasara uğratılırlar^{66,67}.

2.6.2. Kazanılmış İmmun Cevap

Doğal cevap elemanlarının uyarılmasıyla tetiklenen, T ve B lenfositlerin işlev gördüğü, çok fazla sayıda antijenik determinantı tanıyabilecek kapasitede olan repertuvarın arasından değişken gen parçalarının yeniden düzenlenmesi ve klonal seçilimi ile sürdürülen, tek bir antijenik determinanta karşı oluşan hafızalı cevaptır. Hücresel immün cevap, T hücre aktivasyonu ve onların efektör işlevleri ile yürütülür. Humoral immün cevap ise B lenfosit olgunlaşması ve antikor sentezi ile sağlanmaktadır. Yardımcı T lenfositler antikor gelişimine, immünglobulin izotipi değişimine ve bellek oluşumuna katkı sağlarken, B lenfositler antijen sunan hücreler olarak T lenfositlere destek olur⁶⁸.

2.6.2.1. Humoral İmmun Cevap

M. tuberculosis hücre içi bir patojen olduğundan dolayı humoral immün cevap eradikasyonda tek başına yeterli değildir. Enfeksiyonun ilk dönemlerinde antikorlar, opsonizasyon, kompleman aktivasyonu, sitokin cevabının artırılması, antikor bağımlı sitotoksikite, artmış antijen sunumu sayesinde tüberküloz basilinin özellikle mukozal yolla alınmasını önleyebilmektedirler⁶⁹.

2.6.2.2. Hücresel İmmun Cevap

M. tuberculosis enfekte ettiği hücre içerisinde çoğu patojenin ortadan kaldırılmasını sağlayan mekanizmaların üstesinden gelerek uzun yıllar dormant basil şeklinde hayatta kalabilmektedir. Hücresel cevap, latent tüberküloz basilinin enfeksiyon hastalığı oluşturmalarını engelleyerek kontrol altında tutar. 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 artar⁷⁰. Lenf düğümlerinde CD4+ yardımcı T lenfositlerle olgun dendritik hücreler etkileştiğinde CD8+ sitotoksik T lenfositler de işlevsel hale gelmektedirler. CD8+ sitotoksik T lenfositler MHC-I ile antijen sunumuna yanıt olarak, başta IFN- γ olmak üzere çeşitli sitokinler salgırlar. Ayrıca perforin, granzim ve granülizini ile enfekte hücreler ve tüberküloz basiline karşı sitolitik aktivite gösterirler²⁴. CD4+ hücreler içerisinde CD25 molekülünü yüksek düzeyde sentezleyen regülatör T lenfositler bulunmaktadır. Regülatör T lenfositler yüzey temasıyla CD4+ ve CD8+ T lenfositleri baskılanmakta, IFN- γ sentezini ve T hücre proliferasyonunu durdurmaktadırlar. Çoğunlukla CD4+ CD25+ fenotipik özellik gösteren bu T lenfosit alt grubu otoimmün reaksiyonları önleyen periferik toleransı sağlamaktadır^{71,72}.

2.7. Tüberküloz Tedavisi

Günümüzde tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar, birinci seçenek (primer, major) ve ikinci seçenek (sekonder, minör) ilaçlar olarak iki grup altında incelenebilir⁷³.

2.7.1. Birinci Seçenek İlaçlar

İzoniazid, rifampisin, streptomisin, etambutol ve pirazinamid'den (PZA) oluşmaktadır. Bu ilaçların toksisiteleri düşüktür ve kombine kullanılmaları durumunda oldukça etkililerdirler. Basiller duyarlı olduğu sürece tüberküloz tedavisi bu ilaçlardan oluşan tedavi rejimleri ile yapılmalıdır^{74,75}.

2.7.2. İkinci Seçenek İlaçlar

PAS (Para-amino salisilik asit), kanamisin, amikasin, ofloksasin, siprofloksasin, kapreomisin, etionamid, tiasetazon ve sikloserinden oluşmaktadır. Bu grup ilaçlar, birinci seçeneklere göre daha az etkili, daha toksik, daha pahalı ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır. Birinci seçenek ilaçlara karşı direnç geliştiği ya da toksik etki meydana geldiği durumlarda kullanılırlar⁷³.

2.8. İlaç Direnci

Birçok bakteride görülenin aksine *M. tuberculosis*'de plazmid veya transpozonlar aracılığı ile oluşan horizontal gen transferine bağlı direnç görülmemektedir. *M. tuberculosis*'de ilaç direnci her antibiyotik için farklı sıklıkta olmak üzere spontan kromozomal mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. RIF'e dirençli mutantların ilaçsız ortamda prevalansı 10^{-8} , INH'a dirençli mutantların ise 10^{-6} 'dır. Akciğer tüberkülozunda bir kavite ortalama 10^7 - 10^9 basil içermektedir. Bu durumda, kaviter lezyonların içinde çok az sayıda da olsa genetik olarak ilaç direnci olan kökenler bulunabilmektedir. İlaç dirençli bu mutantlar duyarlı mikroorganizmalar arasında dilue olmaktadır. Büyük kaviter lezyonları olan hastalarda tedavide tek bir antibiyotiğin kullanılması veya düzensiz antibiyotik kullanımı ile duyarlı mikroorganizmalar baskılanmakta ve ilaca dirençli kökenler seçilerek bakteri topluluğu içinde baskın duruma geçmektedirler. Tedavi sırasında gelişen bu dirence 'kazanılmış direnç' veya 'sekonder direnç', oluşan dirençli kökenlerin başka bir hastaya bulaştırılması ile ortaya çıkan dirence ise 'primer ilaç direnci' denilmektedir^{76,77}. En az bir tüberküloz ilacına dirençli olan hastalar 'dirençli olgu' olarak tanımlanır⁷⁴. Son yıllarda artan tüberküloz insidansı ile birlikte ÇİD suşları olarak tanımlanan ve INH ve RIF'in ikisine birlikte direnç gösteren suşlar ile, bu iki major ilacın yanı sıra minor veya

ikinci seçenек ilaçlardan birisine karşı direnç geliştiren artmış ilaç dirençli (XDR) suşların ortaya çıkışı pandemiyi daha büyük tehdit haline getirmiştir^{78,74}.

2.9. Duyarlılık Testleri

Duyarlılık sonuçları olmaksızın yapılan tüberküloz tedavileri, tedavi başarısızlığı riskini ve antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişimini arttırmaktadır. CDC, kültüründe *M. tuberculosis* izole edilen veya üç aylık bir tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden, tedaviye klinik yanıt vermeyen her hastaya direnç testi yapılmasını önermektedir. Ayrıca dirençli tüberkülozlu bir hasta ile temas öyküsü bulunanlar, HIV ile enfekte olup kaviter lezyonları olanlar, düşük sosyoeekonomik koşullarda yaşayanlar, yüksek ilaç direnci bulunan (primer INH direnci % 4'ten fazla) bölgelerde olanlar tedaviye başlamadan önce mutlaka direnç varlığı yönünden incelenmelidir⁷⁹. *M. tuberculosis*' de ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasından sonra hızlı ilaç direnci belirlemeye yönelik moleküler uygulamalar geliřtirilmiştir⁷⁶.

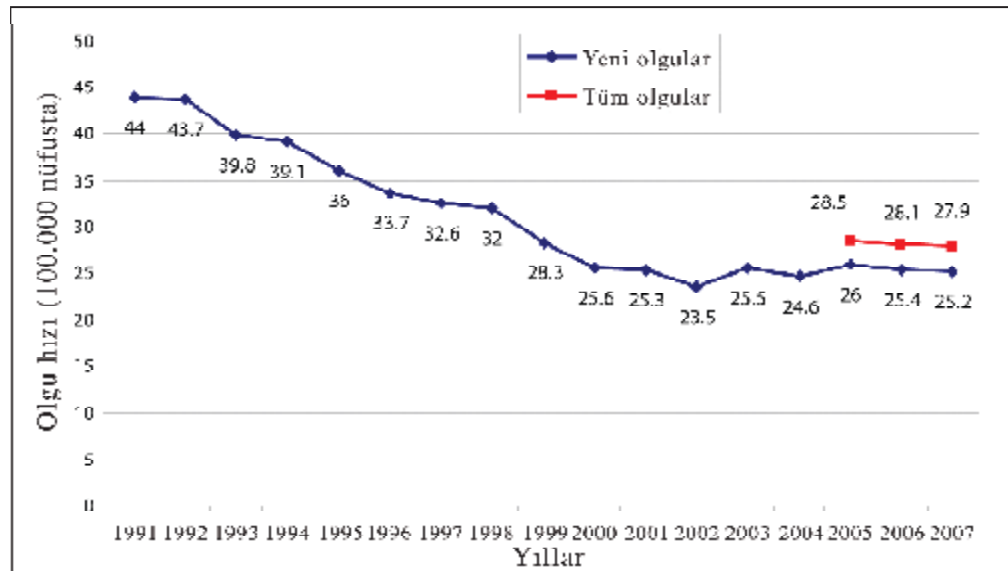
2.10. Epidemiyoloji

Tüberküloz insanlık tarihi kadar eski bir hastalık olmasına rağmen hala tüm dünyada bir toplum sağlığı sorunu olarak önemini korumaktadır. DSÖ raporlarına göre çoğu gelişmekte olan 'Yüksek Olgu Yüğü' olan 22 ülkeden olmak üzere Dünya nüfusunun 1/3'ü hasta olmaksızın tüberküloz basilini taşımaktadır. Yine DSÖ verileri tüberküloza bağlı olarak her yıl yaklaşık iki milyon ve günde 5000 insanın öldüğünü ve ölümlerin % 98'inin dünya nüfusunun % 86'sını oluşturan fakir ülkelerde genç ve erişkinlerde gerçekleştiğini göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde ölüm oranı modern TB ilaçların üretilmesi ile 1950'li yıllardan başlayarak büyük ölçüde düşürülmüştür. Bu tehdit HIV ve çoklu ilaca dirençli ve genişletilmiş ilaca dirençli Tüberkülozun ortaya çıkması ile yeniden alevlenmiş ve 2015 yılına kadar hasta sayısının 50 milyona ulaşacağı, bunların üç milyonunun HIV enfeksiyonu ile birlikte olacağı ileri sürülmüştür^{80,2}.

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 verilmektedir⁸⁰.

Ülkemiz, tüberküloz insidansının orta düzeyde olduğu ülkeler arasında yer almaktadır⁷⁷. 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 verem hastalarının sayısı % 4 düşüş ile 2006 yılında 20,526 iken 2007 yılında 19,694 olmuştur. 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 hastalardan % 89,3'üne mikroskopi yapılmış ve akciğer tüberkülozuların % 64,3'ünde 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, izolatların % 4,9'u çoklu ilaç dirençli olarak tanımlanmıştır⁸¹.



Şekil 3. Türkiye de 1991-2007 yılları arasında tüberküloz insidansı⁸¹

DSÖ global artış trendi karşısında yeni kontrol hedeflerini belirlemiş ve kontrol programlarının başarıya ulaşması için yayma pozitif TB vakalarının en az % 70'ine kalite kontrollü bakteriyolojik tanı konulması ve tanı konulan bu hastaların % 85'inin ise DGT altında başarı ile tedavi edilmesini öngörmüştür⁸¹.

Günümüzde devam eden tehditin daha iyi algılanması korunma ve kontrole yönelik stratejilerin geliştirilebilmesi ve kontrol programlarının başarısının ölçülebilmesi için daha sağlam dayanakları olan epidemiyolojik çalışmalara duyulan ihtiyaç artmıştır. *M. tuberculosis* kompleksinin farklı tür ve genotiplerinin dünyada farklı coğrafi bölgelerde görülme sıklıkları ve bulaş yollarının tespiti ancak moleküler düzeydeki epidemiyolojik çalışmalarla gün ışığına çıkarılabilir^{82,83,2,84}.

2.11. Laboratuvar Tanı

M. tuberculosis tanısında klinik materyal, akciğer tüberkülozu için balgam, bronkoalveoler lavaj ve ince iğne aspirasyon sıvısıdır. Vidalı kapaklı özel taşıma kapları içerisine alınan örnekler oda ısısında 2 saat içerisinde laboratuara taşınmalıdır. Balgam örnekleri kalite yönünden makroskopik olarak incelenmeli red kriterleri taşıyan, yani balgam özelliği olmayanlardan örnekler yeniden istenmelidir. Her örnekten hazırlanan hastabaşı preparasyon veya spot preparasyonlar Erlich Ziehl-Nielsen (EZN) ile boyanarak değerlendirilmeli daha sonra örneğe teksif işlemi uygulanarak aşağıdaki tanı algoritması uygulanmalıdır².

2.11.1. Mikroskopi

Balgam yayması mikroskopisi basit, hızlı ve ucuz bir tekniktir. EZN boyama tekniğinde mikobakteriler mavi zeminde kırmızı basiller, floresan mikroskopide auramine boya kullanılması sonucunda mikobakteriler karanlık zeminde sarı floresan veren basiller görünür. Direkt boyalı preparasyonlarda, balgamda 5.000-10.000 basil/ml varlığında pozitif sonuç alınabildiği için duyarlılık düşüktür. Teksif işlemi ile duyarlılık artırılır².

2.11.2. Kültür

Kültür mikobakterilerin tanısı için referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Kültür için üremenin en erken 21 günde fark edildiği yumurta veya agar bazlı klasik

katı besiyerleri ile üremenin 7-11 gün gibi daha erken sürelerde tespit edildiği modern otomatize sistemlere adapte edilmiş sıvı bazlı besiyerleri kullanılmaktadır. Biyogüvenlikli gelişmiş laboratuvar düzeneklerine duyulan ihtiyaç, rutin mikobakteri kültür uygulanmasını sınırlı hale getirmektedir².

2.11.3. *M. tuberculosis* Kompleksinin Fenotipik İdentifikasyonu

Mikobakterilerin, fenotipik özelliklerine göre tür düzeyinde identifikasyonları 1950' lerden itibaren geleneksel biyokimyasal testler yardımı ile yapılmaktadır. Bu bağlamda koloni morfolojisi, oksijen kullanımı, niasin birikimi, nitrat redüktaz aktivitesi, üreme hızı, tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (TCH) direnci ve pirazinamidaz üretim özellikleri irdelenmektedir. Ancak basilin yavaş üremesi, koloni morfolojisi yorumlarındaki standartsızlık ve ilaçlara çapraz direnç nedeniyle sonuçların güvenilirliği tartışılmaktadır.

2.11.4. *M. tuberculosis* Kompleksinin Genotipik İdentifikasyonu ve Moleküler Epidemiyoloji

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin fenotipe dayalı yöntemlerle birlikte kullanımı, *M. tuberculosis* suşlarının daha kesin olarak birbirinden ayırd edilmesinin yanı sıra, hastalığın ve daha virulan kabul edilen izolatların toplum içinde küresel ve yerel bulaş ve yayılma dinamiklerinin ayrıntılarının daha iyi anlaşılması, kaynak olgular, laboratuvarlardaki kros-kontaminasyonlar ile reaktivasyon ve reinfeksiyon arasındaki farkın tespiti gibi epidemiyolojik yönden son derece değerli olan bilgilere de ulaşılmasını mümkün hale getirmiştir⁸⁵. Bilinen mikobakteri türü sayısı 1983 yılına kadar 53 iken bugün bu yöntemler sayesinde sayı 150'nin üzerine çıkmıştır.

İdeal bir moleküler genotipleme yönteminin, ayırım gücü yüksek, ucuz, hızlı, basit, güvenilir, değerlendirilmesi ve yorumlanması kolay, tekrarlanabilir, üretilen verilerin saklanması laboratuvarlar arası paylaşımı kolay olmalıdır. Yöntem suşa özel, parmak izi "fingerprint" olarak adlandırılan, genetik profili ortaya koyabilmelidir. Farklı hastalardan izole edilen fakat aynı genetik profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkilidir. Bu durumlarda genellikle hastalar arasında yeni bulaşma söz konusudur. Ancak muhtemel bir bulaşın gösterilmesi popülasyonun uygun örneklenmesine, tüberkülozun insidansına, çalışma popülasyonunun yaşı, popülasyon

mobilitesi, ikamet süresi, immün durum gibi özelliklere bağlıdır. Mevcut yöntemlerle oluşturulan gen grupları içerisindeki hastaların yalnızca % 25-42'sinde grup içindeki diğer bireylerle epidemiyolojik ilişki tespit edilmektedir⁸⁶.

Mikobakterilerin tanımlanmasında moleküler yöntemlerin kullanılması MTK'nin tanısında 16S rRNA gen bölgesi diziliminin belirlenmesi için gen problemlerinin kullanılması ile başlamıştır. Bu problemlerle tür düzeyinde tanı yapılamadığı için, sistem modifiye edilerek ve 16S-23S rRNA bölge amplifikasyonu ve reverse hibridizasyon metodunu baz alan INNO-Lipa gibi yöntemler geliştirilerek tür düzeyinde tanımlama mümkün olmuştur. Ayrıca 23S rRNA gen bölgesini hedef alan DNA strip test Geno Type MTBC de bu amaçla kullanılmıştır. Bu test gyrB DNA dizi polimorfizmleri ve bovis BCG RD1 delesyonunu hedef alır. Yine basilin genomunda Exact Tandem Repeat-D (ETR-D; Mikobakteriyel Serpiştirilmiş Tekrarlayan Ünite 4) olarak adlandırılan tekrar dizilerinin polimorfizmi kompleks üyelerinin, tür düzeyinde belirlenmesinde yüksek duyarlılıkta sonuç veren moleküler markerlar olduğu gösterilmiştir².

Behr ve arkadaşları *M. tuberculosis* H37Rv suşları ile genomik karşılaştırılma sonucu *M. bovis* BCG de RD1-16 gibi bazı farklılık bölgelerinin olmadığını belirlemişlerdir. Huard ve arkadaşları MTK içindeki türleri tanımlamak için RD delesyon bölgelerini 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 kompleks üyesi olarak kabul edilmiştir².

Mikobakterilerin genomu homojen ve stabildir. Genomda çok az sayıda sessiz mutasyon meydana gelmekte, genetik rekombinasyonlar, genellikle transpozonlar yoluyla veya tekrarlayan dizilerin polimorfizmi ile gerçekleşmektedir. En basit transpozon Insertion sequence'dir (IS). Genom üzerinde 14'den fazla farklı IS elementi belirlenmiştir². 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)⁸⁵.

Tüm dünyadaki *M. tuberculosis* kompleks içerisinde yer alan türlerin dağılımının ortaya çıkarılması amacıyla standart yöntemlerin kullanılmasına 1993 yılında başlanmıştır. Bu amaçla DNA hibridizasyon yöntemi, IS6110-PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) Spoligotyping ve 12-15-24 lokus MIRU-VNTR (Mycobacterial interspersed repetitive units-Variable Number of Tandem Repeat) yöntemlerinin kombinasyonu kullanılmaktadır⁸⁵.

2.11.4.1. IS6110-PCR-RFLP

IS6110 Restriction Fragment Length Polimorfizm (RFLP) (kesilmiş fragmanların uzunluk polimorfizmi) metodu 1990'larda *M. tuberculosis* epidemiyolojisinde standart tiplendirme yöntemi olarak kabul edilmiştir. MTK izolatlarında Insertion sequence (yerleşim dizilim) IS6110 farklı kopya sayısında ve farklı kromozomal entegrasyon bölgelerinde bulunmaktadır. IS6110 fragmentine dayalı epidemiyolojik çalışmalar yüksek derecede polimorfik olsa da yeterince kararlı ve güvenilir değildir. Düşük kopya sayılı suşlar daha homojen ve epidemiyolojik ilişkili fingerprint analizi yüksek kopya içeren suşlar kadar güvenilir değildir. RFLP yönteminde genomik DNA, *PvuII* restriksiyon endonükleaz ile kesim sonrası DNA fragmentleri jel elektroforezi ile ayrılır, daha sonra southern blot tekniği ile bir naylon membrana transfer edilir. Membrana hibridize olan fragmentler bir IS6110 prob ve kemiluminesan kit kullanılarak görülür hale gelir. Software yazılım programı kullanılarak değerlendirilir. Yöntem yüksek ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği nedeniyle geçtiğimiz yıllar için referans standart metod olarak uygulanmaktaydı. Yoğun üremiş kültüre ihtiyaç duyması, büyük miktarda DNA gerektirmesi, uzun zaman ve yoğun emek istemesi RFLP yönteminin dezavantajlarıdır².

2.11.4.2. Spoligotyping

MTK'i Direct Repeat lokusu CRISPR dizilim (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (düzenli kümelenmiş interspaced kısa palindromik tekrarlar) ailesi üyesidir³⁰.

Spoligotyping yaygın kullanılan PCR bazlı reverse dot blot hibridizasyon metodudur. Klinik laboratuvarlarda, moleküler epidemiyoloji, evrim ve populasyon genetiği araştırmalarında kullanılır. TB için en yaygın epidemiyolojik yöntemdir. Hızlı, basit, tekrarlanabilir bir yöntemdir. Bu yöntemle *M. bovis*, *M. microti* ve *M. canettii* suşları kolayca tiplendirilebilmektedir (Tablo 2).

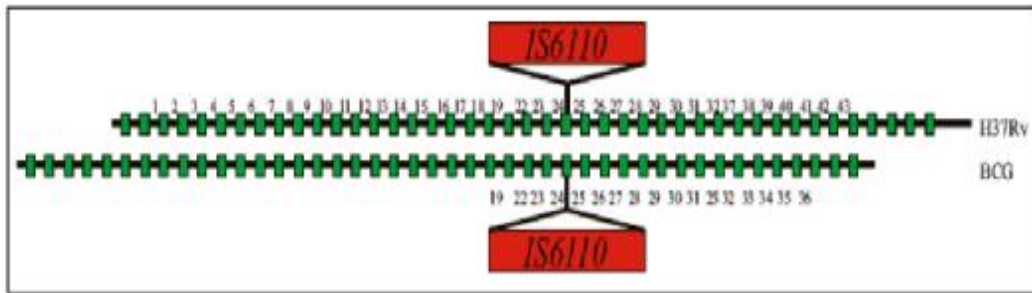
M. tuberculosis kompleksi genomu IS6110 integrasyonunun sıcak noktalarından olan farklı sayıda 36 baz çiftlik DR lokus içerir. DR lokusları aralarında 35-41 baz çifti uzunluğunda aralık oluşturan dizilimler (spacers) bulunmaktadır. DR'lerin kopya sayıları ve spacer dizilimlerin varlığı suşlar arası değişim gösterir. Yöntem 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 bölgelerini içermektedir. Direct repeat bölgelerinin aralarında bulunan 94 farklı spacer tanımlanmıştır, sadece 43 tanesi rutin çalışmalarda kullanılmaktadır (Şekil 4).

Tablo 2. *M. tuberculosis* Kompleksinin Spoligotyping profilleri⁸⁷

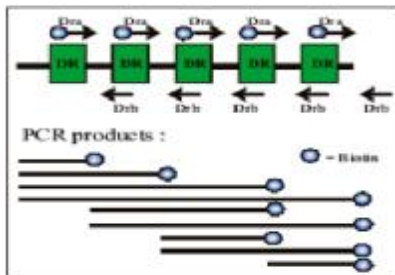
 *M. tuberculosis* H37Rv
 *M. africanum* (Δ8,9,39)
 *M. bovis* / BCG (Δ3,9,16,39-43)
 *M. bovis* (Δ39-43)
 *M. caprae* (Δ3-16,28,39-43)
 *M. pinnipedii* 1
 *M. pinnipedii* 2
 *M. canetti*
 *M. microti* (llama type)
 *M. microti* (vole type)

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

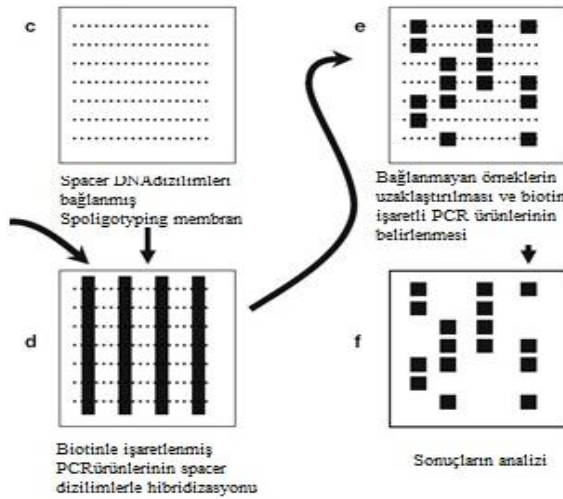
veya yokluğu dijital olarak gözlenmektedir. Hibridizasyon sinyalleri kemifloresan (ECF) veya kemilüminesan (ECL) kit kullanılarak membranının sabitleşme yüzeyinde leke şeklinde görülmektedir. Streptavidin alkalen fosfataz (ECF) veya Streptavidin horseradish peroksidaz (ECL) enzimi kullanılır. Streptavidin alkalen fosfataz enzimine fosfat grubu içeren substrat eklenir^{2,86}. Enzim primerde bulunan biotin grubuna bağlanır, substrat eklenmesi sonrası alkalen fosfataz enzimi substratın fosfat grubunu ayırır ve 450-470 nm dalga boyuna sahip floresan sinyalleri açığa çıkar (Şekil 5, 6).



Şekil 4. *M. tuberculosis* H37Rv ve *M. bovis* BCG suşlarının genomunda bulunan 36 bp' lik DR lokusu⁸⁸



Şekil 5. DR bölgelerinin amplifikasyon prensibi⁸⁸



Şekil 6. Spoligotipleme yönteminin sematik görünümü⁸⁹

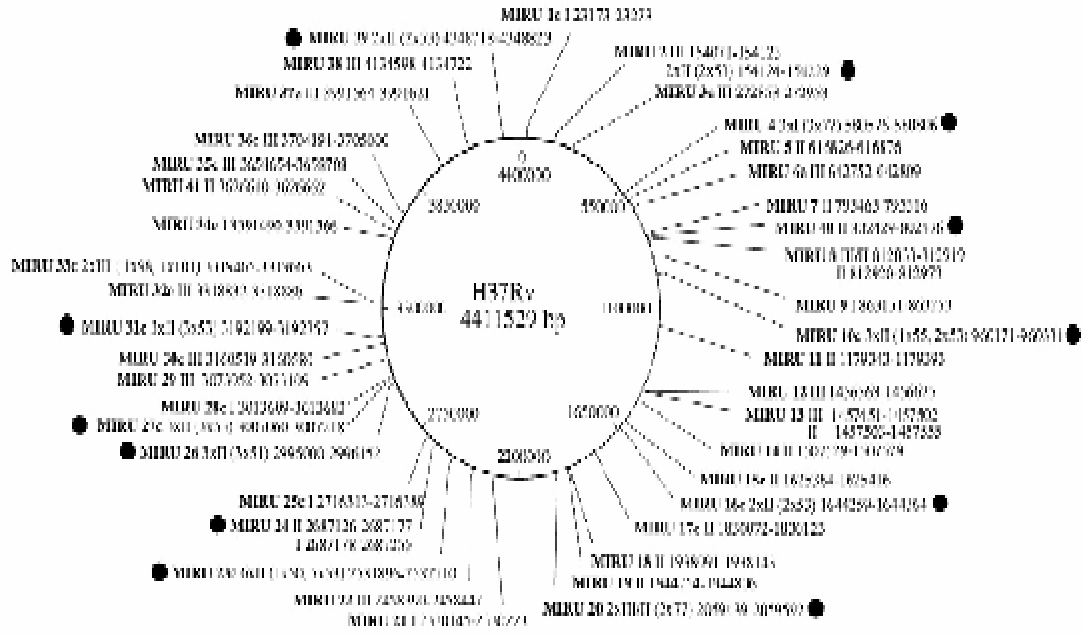
Spoligotyping metodunun major filogenetik dal ayrımı için 1999 yılında Spoligotyping Database1(SpolDB1), 2001’de SpolDB2 ve 2003’de SpolDB3 olmak üzere 3 uluslararası spoligotyping veritabanı oluşturulmuş ve bu veri tabanları baz alınarak MTK’ nin küresel ve yerel coğrafi yapısı kısmen ortaya çıkarılmıştır. Bu veri tabanları yeni, suşların tanımlanmasında yetersiz kalmış, yeni bir genişletilmiş uluslararası spoligotyping veritabanına ihtiyaç duyulmuştur. Nitekim 2006 yılında düzenlenen 4. uluslararası spoligotyping veritabanı SpolDB4 te; 122 ülkeden toplanan 39.295 suşun bilgileri kullanılmıştır. Database’in veri noktaları dünya çapında sekiz bölge içinde değerlendirilmiş olup Avrupa ve Kuzey Amerika tüm girişlerin % 65,5 ini temsil edilmektedir. Afrika, Uzak Doğu, Orta Doğu ve Merkez Asya, Güney Amerika % 6,5-% 8,3 ünü temsil etmektedir. Avrupa ve Güney Amerika’da (sırasıyla % 30 ve % 25) *M. bovis*’ in artmış oranları Güney Amerika (Brezilya ve Arjantin) ve Avrupa’ da sığır ekonomisinin önemi yansıtmaktadır. SpolDB4 toplam 141 ülkenin verilerini temsil etmektedir. 1126 yeni tanımlanmış STs eklenmesi ile MTK’ nin genomik çeşitliliğinin tüm dünyada çok daha yüksek çözünmüş haritası çizilmektedir. Hindistan ve Çin gibi kalabalık ülkelerde TB’nin ve MTK’nin yeni patlamaları görülmektedir. SpolDB4 veritabanına <http://www.pasteur-guadeloupe.fr> adresinden ulaşılmaktadır.

M. bovis ST482-683 ve 479 prototipine bağlı 3 sublineage bölünmüştür. *M. microti* (spacer 37-38 varlığı, ST539) SpolDB3’te ST641’e önerilmiştir. *M. caprae* ve *M. pinipedii* MTK’ nin yeni üyeleri olarak eklenmiştir. *M. africanum* alttürleri

hakkında günümüzdeki bilgilerimiz 68 spacer bölgesinin değerlendirilebilmesi ile olmuştur³⁰. SpolDB4 her yıl gözden geçirilmekte ve yeni genotipler tanımlanmaktadır. Bu çalışmalarda 26 yeni filocoğrafik-spesifik tür MTK genotip familyası eklenmiştir. Spoligotyping, MTK genom çeşitliliğin yanı sıra alt-tür sınıflandırma ve türlerin evrimsel geçmişinin araştırılmasında daha net bir resim sağlamaktadır.

2.11.4.3. MIRU-VNTR

Variable Number Tandem Repeat (VNTR) diziler özellikle yüksek genetik homojenite gösteren, *B. anthracis*, *Y. pestis* ve MTK gibi çeşitli patojen bakterilerde moleküler epidemiyolojik çalışmalarda hedef markerlar haline gelmiştir. Bu bağlamda 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 MTK klonlarının epidemiyolojik özelliklerini tespit etmede en hızlı yöntemdir. *M. tuberculosis* genomunda büyüklükleri 50-100 bp arasında değişen 41 farklı VNTR tanımlanmış ve bunlara MIRU adı verilmiştir (Şekil 7). MIRU lokusları PCR bazlı tiplendirme metodu için hedef dizilimlerdir. Bu bölgeleri içerisine alan komşu bölgeleri tanıyan primerler kullanılarak yapılan PCR ile elde edilen ampliconların büyüklükleri bu bölgelerdeki tekrar sayısının tespitine imkan verir. Sonuçlar, her hedef VNTR ünitesi için kopya sayıları dikkate alınarak yapılan numerik kodlama ile elde edilir. Klonal düzeyde tanı çalışmaları oldukça kullanışlı olan VNTR metodunun ayırmacı gücü IS6110 RFLP kıyasla düşüktür ve epidemiyolojik çalışmalar için başka tiplendirme metodu ile kombinasyonu gereklidir².



Şekil 7 . *M. tuberculosis* genomundaki 41 MIRU bölgesi⁹⁰

Suş tiplendirmede ilk olarak 12 lokus MIRU kullanımı geliştirilmiş olup daha sonra 15 ve 24 lokustan oluşan standart bir format geliştirilmiştir. MIRU-VNTR metodunun, IS6110 RFLP yöntemine benzer ayırım gücü bulunmaktadır⁹¹. Hızlı ve pahalı bir yöntemdir, otomatize edilebilir, tekrarlanabilir, *M. tuberculosis* kompleks izolatları için duyarlı ve özgüdür. Otomatik bir dizi analiz cihazı olan laboratuvarlar için metodu kurmak oldukça kolaydır. Aynı gün içerisinde sonuç verebilmektedir. Altyapı gereksinimleri bu metodu büyük referans ve araştırma merkezleriyle sınırlı hale getirmektedir⁹².

IS6110-RFLP ve Spoligotyping ile kıyaslandığında, MIRU-VNTR tipleme daha fazla ayırıcı profil oluşturmaktadır. MIRU-VNTR genotipleme yönteminin *M. tuberculosis* suşlarının epidemiyolojik ve filogenetik taramasında yeni referans yöntem olması önerilmektedir. Beijing genotipi ayırımında problem görülmekte, metod yeterli gelmemektedir, Spoligotyping gibi diğer bir tiplendirme metodu ile kombinasyonu gerekmektedir².

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 *M. tuberculosis* kompleksi olarak tanımlanan, random örnekleme ile seçilen 467 izolat çalışmaya dahil edildi. İzolatlar, bölgemizde görülen MTK dal ve alt dalları tespit edilerek bölgenin epidemiyolojik özelliklerinin belirlenebilmesi amacı ile 12 lokus MIRU-VNTR ve spoligotyping yöntemlerinin kombinasyonu ile tiplendirildi.

3.1. DNA Ekstraksiyonu

Spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemlerinde kullanılmak üzere seçilen 467 *M.tuberculosis* izolatının DNA sıvının 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 spoligotyping ve ardından 12 lokus MIRU-VNTR 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 çevrildi, 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. Spoligotyping

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

3.2.1. 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.

9.5µl	dH ₂ O
12.5µl	2x PCR Master Mix (Fermantas)
0.25µl	DRa (25pmol/µl)
0.25µl	DRb (25pmol/µl)
2.50µl	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.	} 40 siklus
55°C	1 dak.	
72°C	45 sn.	
72 °C	10 dak.	
4 °C	∞	

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 -20°C'de saklandı.

3.2.2. Spoligotyping Metodunda Kullanılacak Çözeltiler

Spoligotyping metodunda kullanılacak çözeltiler laboratuvarımızda aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

3.2.2.1. 0.5M EDTA (pH 8,0)

EDTA	46,53g
dH ₂ O	250ml
pH 8,0'e ayarlandı ve otoklavlandı.	

3.2.2.2. 20mM EDTA (pH 8,0)

dH ₂ O	960ml
0.5M EDTA	40ml

3.2.2.3. 20x SSPE (pH 7,4)

0,2M Na ₂ HPO ₄	28,39gr/L
3,6M NaCl	210,24gr/L
dH ₂ O	960ml
0,5M EDTA	40ml (Otoklavlanır)

3.2.2.4. 2xSSPE

20 × SSPE	100ml
dH ₂ O	900ml

3.2.2.5. % 10 SDS

Önceden ısıtılmış(60°C) dH ₂ O	250ml
SDS	25gr

3.2.2.6. 2xSSPE / %0.1SDS

dH ₂ O	890ml
20 × SSPE	100ml
% 10 SDS	10ml

SSPE solüsyonu ve SDS solüsyonu ayrı mezurlarda ölçüldü.

3.2.2.7. 2xSSPE / %0.5SDS solüsyonu

dH ₂ O	850ml
20 × SSPE	100ml
% 10 SDS	50ml

3.2.2.8. % 1 SDS

% 10 SDS	100ml
dH ₂ O	900ml

3.2.2.9. 10 × TE

Tris HCl	15,764g (100mM)
0,5M EDTA	20ml (10mM)
dH ₂ O	980ml

3.2.3. 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 alkalen 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) 150µl 2xSSPE / % 0,1 SDS üzerine 20µl 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 (FINEPCR- 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 1,25µl 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 (Attotech AP Fluorescent 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.

3.2.4. 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.

3.2.5. Yorumlama

Spoligotyping metodu sonuçların yorumlanması aşamasında spacer oligonükleotidlerin 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 (Tablo-3). Elde edilen veriler SpolDB4 veritabanı kullanılarak kümeler ve familyalar (clade) belirlendi.

Database adres:

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

Tablo 3. Spoligotyping sonuçlarının değerlendirilmesinde kullandığımız Oktal kod anahtarı

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

3.3. MIRU-VNTR

Bu çalışmada 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanıldı. Hedeflenen MIRU lokusları için literatürde belirtilen primerler sentezlendi (Tablo 4). Her bir suşa özgü 12 MIRU lokusunun VNTR sayısının belirlenmesi için 12 PCR reaksiyonu gerçekleştirildi^{91,92,93}.

PCR için reaksiyon karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

dH ₂ O	2,170 µl
DMSO (SIGMA)	0,250 µl
2X PCR Master mix	3,125 µl
Forward Primer	0,040 µl
Rewerse Primer	0,040 µl
DNA	0,625 µl
Toplam	6,250 µl

2X PCR Master Mix (Fermantas):

4mM MgCl₂

1,6 mM dNTP mix (her bir dNTP 0,4 mM)

0,05 u/ µl Taq DNA Polimeraz içermektedir.

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

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

Tablo 4. 12 Lokus MIRU VNTR metodu için kullanılan primerler^{91,92,93}

Hedef Bölge	PCR primer (5' to 3')
MIRU 2a	5'-TGG ACT TGC AGC AAT GGA CCA ACT-3'
MIRU 2b	5'-TAC TCG GAC GCC GGC TCA AAA T-3'
MIRU 4a	5'-GCG CGA GAG CCC GAA CTG C-3'
MIRU 4b	5'-GCG CAG CAG AAA CGT CAG C-3'
MIRU 10a	5'-GTT CTT GAC CAA CTG CAG TCG TCC-3'
MIRU 10b	5'-GCC ACC TTG GTG ATC AGC TAC CT-3'
MIRU 16a	5'-TCG GTG ATC GGG TCC AGT CCA AGT A-3'
MIRU 16b	5'-CCC GTC GTG CAG CCC TGG TAC-3'
MIRU 20a	5'-TCG GAG AGA TGC CCT TCG AGT TAG-3'
MIRU 20b	5'-GGA GAC CGC GAC CAG GTA CTT GTA-3'
MIRU 23a	5'-CAG CGA AAC GAA CTG TGC TAT CAC-3'
MIRU 23b	5'-CGT GTC CGA GCA GAA AAG GGT AT-3'
MIRU 24a	5'-CGA CCA AGA TGT GCA GGA ATA CAT-3'
MIRU 24b	5'-GGG CGA GTT GAG CTC ACA GAA-3'
MIRU 26a	5'-CCC GCC TTC GAA ACG TCG CT-3'
MIRU 26b	5'-TGG ACA TAG GCG ACC AGG CGA ATA-3'
MIRU 27a	5'-TCG AAA GCC TCT GCG TGC CAG TAA-3'
MIRU 27b	5'-GCG ATG TGA GCG TGC CAC TCA A-3'
MIRU 31a	5'-ACT gAT TGG CTT CAT ACG GCT TTA-3'
MIRU 31b	5'-GTG CCG ACG TGG TCT TGA T-3'
MIRU 39a	5'-CGC ATC GAC AAA CTG GAG CCA AAC-3'
MIRU 39b	5'-CGG AAA CGT CTA CGC CCC ACA CAT-3'
MIRU 40a	5'-GGG TTG CTG GAT GAC AAC GTG T-3'
MIRU 40b	5'-GGG TGA TCT CGG CGA AAT CAG ATA-3'

Amplikonlar 120 Voltta, 60 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 12 lokus MIRU-VNTR tiplleme sonucunda her bir MIRU lokusunda bulunan allel tekrar sayısı belirlendi (Tablo 5).

Tablo 5. MIRU lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve ampikon boyutları

<u>Allel tekrarı</u>	<u>maru 02</u>	<u>maru 04</u>	<u>maru 10</u>	<u>maru 16</u>	<u>maru 20</u>	<u>maru 23</u>	<u>maru 24</u>	<u>maru 26</u>	<u>maru 27</u>	<u>maru 31</u>	<u>maru 39</u>	<u>maru 40</u>
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330	1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164

BULGULAR

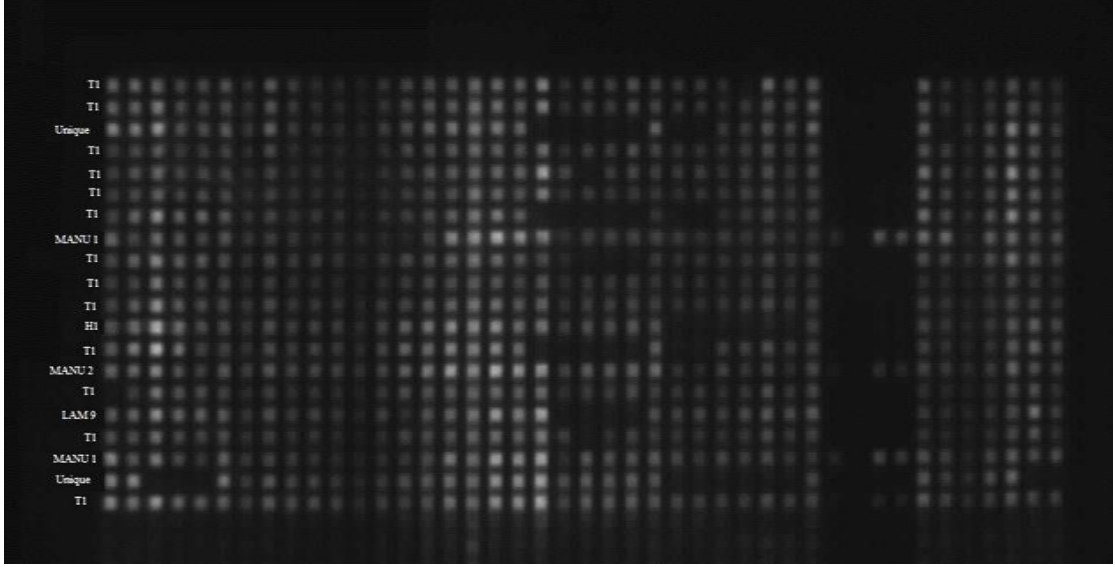
Ocak 2007- Haziran 2010 yılları arasında Çukurova bölgesinde bulunan Adana, Mersin, Antakya, Osmaniye, Gaziantep, Kahramanmaraş ve Şanlıurfa’da bulunan 1 Göğüs Hastalıkları Hastanesi ve 2 Devlet Hastanesi olmak üzere 3 yataklı hastane ile 17 Verem Savaşı Dispanserinden Çukurova Üniversitesi Tropikal 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 randomize seçilen 467 suş, MTK’nin bölgemizdeki epidemiyolojik özelliklerini tespit amacı ile MIRU-VNTR ve Spoligotyping yöntemleri ile değerlendirildi.

Çalışmaya dahil edilen toplam 467 izolatın Spoligotyping metodu ile elde edilen klonal grup dağılımında; 443 suşun (% 88) 21 küme içerisinde yoğunlaşmıştı, X1 genotipine ait 1 izolat bulunduğu, 24 suşun (% 5,1) ise SpolDB4 veri bankasındaki suşlarla karşılaştırma sonucunda bilinen hiçbir kümeye uymayan orphan suşlar oldukları görüldü. En büyük kümenin 239 izolat (% 51,9) ile T1 kümesi olduğu, ikinci sırada LAM7 TUR ailesinin 54 izolat (% 11,5) içerdiği, EAI5/EAI3 ailesinin 23 izolat (% 4,92), H3 ailesinin 22 izolat (% 4,71), MANU 1 ailesinin 21 izolat (% 4,49), H4 ailesinin 10 (% 2,14), U, MANU2 ve LAM3/S ailelerinin 8 izolat (% 1,71), T3 ve H1 ailelerinin 7 izolat (% 1,49), EAI5 ve Beijing ailelerinin 6 izolat (% 1,28) içerdiği görüldü. En küçük kümelerin, T2 ailesine ait 5 izolat (% 1,07), LAM9 ailesine ait 4 izolat (% 0,85), CAS1-Delhi ailesine ait 3 izolat (% 0,64), H2 ailesine ait 3 izolat (% 0,43), LAM3, X3, BOV ve Bovis 1 ailelerine ait 2 izolat (% 0,43) ve X1 ailesine ait 1 izolat (% 0,21) içerdiği görüldü (Şekil 8) (Tablo 6).

Tablo 6. 467 suş a ait Spoligotyping aileleri ve görülme oranları

SPOLOGOTYPING AİLE	SUŞ SAYISI	GÖRÜLME SIKLIĞI (%)
T1	239	51,17
LAM7 TUR	54	11,5
EAI5/EAI3	23	4,92
H3	22	4,71
MANU1	21	4,49
H4	10	2,14
U	8	1,71
MANU2	8	1,71
LAM3/S	8	1,71
T3	7	1,49
H1	7	1,49
EAI5	6	1,28
Beijing	6	1,28
T2	5	1,07
LAM9	4	0,85
CAS1-Delhi	3	0,64
H2	3	0,43
LAM3	2	0,43
X3	2	0,43
BOV	2	0,43
Bovis 1	2	0, 43
X1	1	0, 21
Unique	24	5,14
Toplam	467	100

Çalışmaya dahil edilen izolatların aile içerisi dağılımlarının il bazında değerlendirilmesi sonucu Adana ilinde en sık görülen T1 ailesinin görüldüğü bunu LAM7 TUR ailesinin izlediği görüldü. *M. tuberculosis* Beijing ailesine ait izolatların, Urfa ile sınırlı kaldıkları, Hatay ve Gaziantep suşlarının da Adana suşları gibi T1 ağırlıklı oldukları görüldü (Tablo 7).



Şekil 8- Spoligotyping görüntüsü

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 467 izolata Spoligotyping metodu uygulaması sonucu en fazla görülen aile 239 izolat içeren % 51,9 oranı ile T1 ailesidir. T1 ailesi 215, 18, 6 suş içeren 3 farklı spoligotyping paterni göstermiştir. 215 suş içeren alt grubun database ile karşılaştırılması sonucunda, T1 ailesinin SpolDB4 database’de görülme sıklığı % 6,3 iken bizim çalışmamızda % 46 oranında görülmüştür. 215 suş içeren T1 alt kümesinin çalışmamızda görülme sıklığının SpolDB4 database de görülme sıklığına oranı 0,08 bulunmuştur (Tablo 8).

Çalışmaya dahil edilen izolatların Spoligotyping ve 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile değerlendirilmesi sonucunda izolatların spoligotyping grupları içerisinde çok sayıda subgroup oluşturdıkları görüldü (Şekil 9).

Çalışmamızda Çukurova bölgesinde bulunan 7 ilden izole edilen 467 MTK suşunun Spoligotyping yöntemi ile değerlendirilmesi sonucunda, 24 suşun database’de karşılığı olmayan orphan izolatlar olduğu, 443 suşun içerdiği izolat sayısı 2-215 arasında değişen 21 küme içerisinde toplandığı görülmüş, kümeleşme oranı % 94,9 bulunmuştur. 12 lokus MIRU-VNTR metodunun Spoligotyping metodu ile kombinasyonu sonucunda 443 izolat içeren 21 küme alt kümelere bölünmüştür. Örneğin en fazla suş içeren T1 (n= 239) ailesi 12 lokus MIRU-VNTR metodu ile kombinasyonu sonucunda 21 unique profil görülmüş ve 218 suş içerdiği izolat sayısı 2-158 arasında değişen 7 kümede toplanmıştır. İkinci sırada görülen LAM7 TUR ailesine

ait 54 izolat 6 unique profil oluşturmuş ve kalan 48 suş içerdiği izolat sayısı 3-29 arasında değişen 5 kümede toplanmıştır (Tablo 9).

Tablo 7. 467 suşa ait Spoligotyping ailelerinin 7 İilde görülme oranları

AİLE	ADANA		HATAY		G.ANTEP		K.MARAŞ		MERSİN		Ş.URFA		OSMANİYE	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
T1	56	3,7	57	1,3	71	65,7	6	100	7	58,3	38	53,5	4	57,1
LAM7 TUR	12	9,3	10	9	16	14,8	-		5	41,6	8	11,2	3	42,9
EAI5/EAI3	16	12,5	7	6,3	-		-		-		-		-	
H3	6	4,6	9	8,1	3	2,7	-		-		4	5,6	-	
MANU1	13	10,1	4	3,6	2	1,8	-		-		2	2,8	-	
H4	2	1,5	4	3,6	2	1,8	-		-		2	2,8	-	
U	2	1,5	3	2,7	-		-		-		3	4,2	-	
MANU 2	2	1,5	4	3,6	2	1,8	-		-		-		-	
LAM3/S	-		-		6	5,5	-		-		2	2,8	-	
T3	3	2,3	2	1,8	1	0,9	-		-		1	1,4	-	
H1	2	1,5	2	1,8	3	2,7	-		-		-		-	
EAI5	6	4,6	-		-		-		-		-		-	
Beijing	-		-		-		-		-		6	8,4	-	
T2	2	1,5	2	1,8	-		-		-		1	1,4	-	
LAM 9	-		-		2	1,8	-		-		2	2,8	-	
CAS1-Delhi	1	0,7	2	1,8	-		-		-		-		-	
H2	1	0,7	2	1,8	-		-		-		-		-	
LAM3	1	0,7	1	0,9	-		-		-		-		-	
X3	-		-		-		-		-		2	2,8	-	
BOV	1	0,7	1	0,9	-		-		-		-		-	
Bovis 1	2	1,5	-		-		-		-		-		-	
X1	-		1	0,9	-		-		-		-		-	
TOPLAM	128	100	111	100	108	100	6	100	12	100	71	100	7	100

Tablo 8. 467 izolatın gösterdiği 23 Spoligotyping ailesinin Spol DB4 ile karşılaştırılması

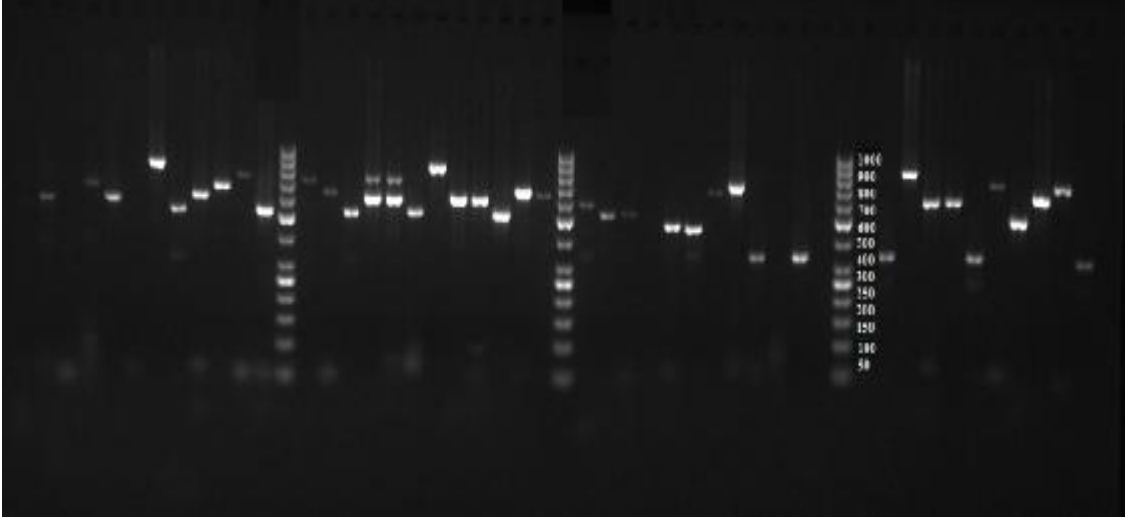
[illegible]

DB %*: Spoligotyping ailesinin Database'de görülme yüzdesi

Çalışma TSS*/DB TSS* : Çalışmada bulunan bir aileye ait toplam suş sayısının SpolDB4 database' de bulunan toplam sayısına oranı

Tablo 9. Spoligotyping T1 ailesine ait 24 izolatın 12 lokus MIRU-VNTR profili

	Suş No	Yer	Tarih	SİRE	Spoligotyping	Oktal kod	Aile	MIRU-VNTR
1	1217	HVSD	06-2008	SSSS		77777777760771	T1	223423153322
2	913	ÇVSD	04-2008	SSSS		77777777760771	T1	223326153322
3	1539	GHH	08-2008	SRSS		77777777760771	T1	223423153322
4	1086	HVSD	07-2008	SSSS		77777777760771	T1	223326153322
5	1465	ÇVSD	07-2008	SSSS		03763777760771	T1	223326153322
6	1495	ÇVSD	07-2008	SRSS		77777776360771	T1	223326153322
7	1065	CVSD	05-2008	SRSR		77777777760771	T1	223225153321
8	1390	HVSD	04-2009	SSSS		77777777760771	T1	223326153322
9	1256	ÇVSD	06-2008	SSSS		77777777560771	T1	223326153322
10	647	HVSD	01-2010	SSSS		37777777760771	T1	223326153322
11	1541	HVSD	08-2008	SRSS		77777637760771	T1	223323123322
12	1590	CVSD	08-2008	SRSS		77777777760771	T1	223326153322
13	1392	GHH	07-2009	SRSS		77777777760771	T1	223423153322
14	57	HVSD	08-2009	SSRS		77777677760771	T1	223326153322
15	1706	HVSD	02-2010	SSSS		77377777760771	T1	223326153322
16	951	ÇVSD	05-2010	SSSS		777777404760771	T1	223125143324
17	1045	HVSD	05-2008	SRRS		77777777760771	T1	223326153322
18	2003	KVSD	06-2010	SSSS		77777777760771	T1	223225153321
19	416	Urfa	07-2007	SSSS		77777777760771	T1	223125153321
21	80	Urfa	04-2009	SRSR		03763777760771	T1	223225153321
22	619	Urfa	06-2009	SSRS		77777777760771	T1	223225153321



Şekil 9- MIRU-VNTR jel görüntüsü

TARTIŞMA

Tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen tüberküloz, tüm dünyada AIDS'den sonra erişkinlerde en çok ölüme yol açan ikinci enfeksiyon hastalığı olarak önemini korumaktadır⁸¹. Tüberkülozla etkin bir mücadele için hızlı ve duyarlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesinin yanı sıra son yirmi yılda, daha yüksek ayırım gücüne sahip moleküler epidemiyolojik yöntemlerin geliştirilmesi araştırmacıların ilgi odağı olmuştur⁸².

Dünyadaki aktif tüberkülozlu hastaların % 86'sı gelişmekte olan ülkelerde yaşamakta olup tüberkülozdan ölümlerin % 95'i yine bu ülkelerde görülmektedir. 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 sokmaktadır⁸³.

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 kazanmıştır⁸¹.

Tüm dünyada Tüberküloz kontrol programları bu yeniden önem kazanan tehdidi kontrol altına almaya yönelik olarak yeniden revize edilmiştir. Bu revizyonda tanıda duyarlılığın artırılması tedavinin sağlık personeli gözetiminde tamamlanması ve MTK suşlarının ülkeler ve bölgeler arası hareketlerinin izlenmesi ana ilke olarak belirlenmiştir. MTK suşların izlenmesinde fenotipik karakterlere dayalı ayırımın yerini genotipik özelliklere dayalı spoligotiplleme ve MIRU-VNTR gibi moleküler bazlı yöntemler almıştır. Bu yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda iyi kontrol

programı uygulanan ülkelerde Beijing suşlarının oldukça düşük oranlarda görüldüğü tespit edilmiştir.

Nitekim Lari N. ve arkadaşlarının 2005 yılında İtalya-Tuscany de hastanede 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 LAM9 ailesini % 5,2 oranları ile Tuscany de en baskın görülen 3 spoligotyping ailesi olarak tanımlamışlar, Beijing ailesine ait 7 (% 2,8) suş tespit etmişlerdir⁹⁴.

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 bildirilmiştir⁹⁵.

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 bildirmişlerdir⁹⁶.

Bölgemiz coğrafyasında yer alan ülkeler arasında *M. tuberculosis* kompleksi üyelerinin moleküler epidemiyolojik yöntemler kullanılarak izlendiği çalışmaların sayısı oldukça sınırlı olup, çoğunluğu son bir kaç yıl içerisinde yapılmıştır. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar beklendiği gibi batı komşularımızda sınırlı sayıda bildirilmesine karşılık doğu komşularımızda Beijing genotipinin giderek artan sıklıkta görülmeye başladığını ortaya koymaktadır.

Nitekim Bulgaristan' ın farklı bölgelerinden izole edilen 113 *M. tuberculosis* suşunu, Spoligotyping ve MIRU-VNTR metodu ile genotipik özellikleri yönünden değerlendiren Valcheva V. ve arkadaşları (2008), Spoligotyping uygulaması sonucunda 2-29 suş içeren 15 küme elde etmişler ve 5 suşun tek üyeli özel küme oluşturduklarını görmüşlerdir. En büyük kümenin % 25,7'lik oran ile T1(ST53) ailesi suşlarına ait olduğunu, LAM7 TUR (ST41) ailesinin % 5,4 oranı ile 2. sırada yer aldığını bildirmişlerdir. LAM7 TUR prevalansının dünya ortalamaları üzerinde bulunmasını Türkiye ile komşuluğuna bağlayan araştırmacılar, *M. tuberculosis* genotiplerinin yayılımında göçlerin önemine dikkat çekmişlerdir⁹⁷.

Gencer B., Shinnick TM. ve arkadaşları da 2005 yılında İran ve komşu ülkelerinde bulunan *M. tuberculosis* suşlarının spoligotyping paternlerini belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada İran ve Afgan tüberküloz hastalarına ait örneklerden 1,742 *M. tuberculosis* suşu izole etmişler ve sonuçları Türkiye ve Pakistan ile karşılaştırmışlar. T, CAS, EAI ve LAM ailelerinin baskın olduğunu görmüşler . İran'da %32,3 ve Türkiye'de % 36,5 oranları ile T ailesi, Pakistan'da % 61,3 ve Afganistan'da % 27,4 oranları ile CAS ailesinin baskın olduğunu, % 1,8 (7 suş) oranında Beijing genotipine ait izolat bildirmişlerdir. Pakistan ve Afganistan'da bulunan suşların çoğunluğunun atasal suşlara, Türkiye'de bulunanların modern TB suşlarına ait olduğunu, İran'da ise atasal ve modern TB suşlarının eşit oranda görüldüğünü belirtmişlerdir⁹⁸.

Diğer taraftan Rohani M. ve arkadaşları (2009) İran-Horasan bölgesinden topladıkları 113 *M. tuberculosis* izolatını değerlendirdikleri çalışmalarında, birden fazla izolatın 17 spoligo kümesi içerisinde toplandığını, 57 izolatın tek üyeli özel kümeler oluştururken, 32 izolatın spoligotyping uygulaması sonucunda tespit edilemeyen orphan patern olduğunu bildirmişlerdir. Bu grup en büyük kümenin 13 suş içeren orphan paternden oluştuğunu, Beijing genotipinin % 7,1 oranında olduğunu bildirilmişlerdir⁹⁹.

Nieman S. ve arkadaşları 2010 yılında Gürcistan'da Beijing ailesinin yayılımını araştırdıkları çalışmada Spoligotyping metodu ile 183 *M. tuberculosis* izolatını değerlendirmişlerdir. Bu grup değerlendirdikleri suşların % 26'sının Beijing, % 18'inin LAM, % 12'sinin Ural ve % 5'inin de Haarlem ailelerine ait olduklarını göstermişlerdir⁹².

Sınırlı sayıda da olsa bu literatür verileri tüm dünyada olduğu gibi bölgemiz ülkelerinde de *M. tuberculosis* Beijing suşlarının giderek artan oranlarda görülmeye başladığını göstermektedir.

Tüberküloz ülkemizde 1940-50'li yıllarda uygulanan sıkı kontrol programları ile kontrol altına alınmışken elde edilen başarıya duyulan güven sonucu programların gevşetilmesi ile birlikte tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yeniden artış trendine girmiştir. Özellikle düşük sosyoekonomik seviyeye sahip olup tüberküloz insidansının ve çeşitliliğinin fazla olduğu Güney Doğu Anadolu bölgesine komşu olan Çukurova bölgesi riskli bölgeler arasında yer almaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda Güney Doğu Anadolu bölgesinde varlığı bildirilen *M. tuberculosis* Beijing suşu bölgemizi de tehdit etmektedir. Bu bağlamda bölgemizde salgın veya sporadilere sebep olan tüberküloz suşlarının klonal düzeyde takibi bir taraftan reinfeksiyon ve reaktivasyonun tespiti yolu ile tedavi başarısını diğer taraftan da bölgemizdeki MTK popülasyonunun yapısı ve bu popülasyona olması muhtemel yeni girişlerin tespiti ile kontrol programlarının başarısını göstermesi açısından son derece önemlidir. Ancak bölgemizde daha önce klonal düzeyde suş tanımlaması yapabilen moleküler yöntemlerin kullanımı ile gerçekleştirilen böyle bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada MIRU-VNTR ve spoligotyping yöntemleri kullanılarak tüberküloz epidemiyolojisinin bölgemizdeki yapısı hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilecek bilgilerin, bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı ve yıllık epidemiyolojik bulgularla bu güne ait bulguların kıyası ile bölgemizdeki tüberküloz epidemiyolojisinin karakterini ortaya koyacağı düşünülmüştür.

Bu amaçla 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 467 MTK suşu değerlendirilmiş, suşlardan 24'ü (% 5,1) orphan suş olarak tanımlanmış, kalan 443 izolat üye sayısı 2-215 arasında değişen 21 küme içerisine dağılmıştır. Kümeleşme oranının % 94,9 olduğu görülmüştür. 12 lokus MIRU-VNTR metodunun Spoligotyping metodu ile kombinasyonu sonucunda 443 izolat içeren 21 küme, alt kümelere bölünmüştür. Örneğin en fazla suş içeren T1 (n= 239) ailesi 12 lokus MIRU-VNTR metodu ile kombinasyonu sonucunda 21 tek üyeli özel küme profili görülmüş ve 218 suş içerdiği izolat sayısı 2-158 arasında değişen

7 kümede toplanmıştır. İkinci sırada görülen LAM7 TUR ailesine ait 54 izolat 6 unique profil oluşturmuş ve kalan 48 suş içerdiği izolat sayısı 3-29 arasında değişen 5 kümede toplanmıştır (Tablo 8).

Bölgemizde egemen suşun T1 ailesine ait suşlar olduğu, bunu LAM7 TUR ailesinin izlediği ve Urfa örnekleri dışında Beijing ailesinden suşların diğer illerimizde henüz görülmediği tespit edilmiştir. Bu bulgular bölgemizin, ülkemizin farklı bölgelerinden toplanan suşlarla yapılan genotiplendirme çalışmalarında elde edilen profile benzer olduğunu göstermiştir.

Ankara ve Malatya bölgesine ait 245 *M.tuberculosis* klinik izolatının değerlendirildiği bir çalışmada Zozio T. ve arkadaşları (2005), Spoligotyping metodu ile 206 izolatın 33 kümede toplandığını, 39 izolatın ise tek üyeli özel kümeler içerisinde yer aldıklarını belirterek, en büyük kümeyi % 21 oranında LAM7 TUR (ST41) ailesinin oluşturduğunu bunu sırası ile % 16,3 oranı ile T1(ST53) ve % 5,3 oranı ile Haarlem 3 (ST50) ailelerine ait kümelerin izlediğini bildirmişlerdir⁸⁴.

Günel.S (2006) ve arkadaşları Malatya’da 450 *M.tuberculosis* izolatını değerlendirdikleri çalışmada T süper ailesinin % 38,6 ile bölgede en sık karşılaşılan aile olduğunu bunu, % 27,3 ile LAM7 TUR ve % 14,8 oranı ile Haarlem ailelerine ait suşların izlediğini bildirmişlerdir. Bu grup Beijing genotipinden 4 ve Hindistan’ın Delhi bölgesine özgü CAS1-Delhi genotipinden 2 suş tespit etmişlerdir⁸⁵.

Aynı bölgede bir yıl ara ile yapılan ikinci çalışmada 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 bildirmişlerdir. Bu grup Günel S. ve arkadaşlarının bulgularından farklı olmak üzere, suşların % 23,9’unun LAM7 TUR ailesi içerisinde yoğunlaştığını bunu % 22,5 oranı ile T1 ailesine ait suşların izlediğini bildirmişlerdir. Bu grup çalışmaya dahil ettikleri suşlardan 142’sini 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile klonal düzeyde tekrar değerlendirmişler ve sonuç olarak 98 izolatın 21 küme içerisine dağıldığını, kümeleme oranı % 69 olduğunu ve 44 (% 31) izolatın ise tek üyeli kümelerde kaldıklarını belirtmişlerdir⁸⁶.

Bize komşu bölgelere ait bu çalışmalardan, Günel S. ve arkadaşlarının kendi izolatlarından elde ettikleri klonal dağılım sıralaması bizim sıralamamızla benzerlik göstermekle birlikte, oranlarımızdaki farklılık dikkat çekicidir. Günel S. ve arkadaşları

Malatya bölgesi izolatları arasında en sık karşılaştıkları genetik klonun % 38,6 ile T ailesine ait suşlardan oluştuğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da tespit edilen en büyük gen kümesi T ailesi suşları kümesidir, ancak bu suşlar tüm suşların % 51,9'unu oluşturmuştur. Buna karşılık Durmaz R. ve arkadaşları Günel S. ve arkadaşları gibi Malatya bölgesinden izole edilen suşlarla ve aynı yöntemleri kullanarak yaptıkları çalışmada en büyük kümeyi % 23,9' luk oran ile LAM7 TUR ailesi suşlarının oluşturduğunu, T ailesinin ise % 22,5 ile 2. sırada yer aldığını bildirmişlerdir. Yine Zozio ve arkadaşları da Malatya bölgesi ağırlıklı izolatları değerlendirdikleri çalışmalarında, Durmaz R. ve arkadaşları gibi en büyük kümeyi % 21 oranı ile LAM7 TUR ailesinin oluşturduğunu belirtmişlerdir^{84,85}. Oysa bizim çalışmamızda LAM7 TUR ailesi suşları % 11,5 oranı ile 2. büyük kümeyi oluşturdu. Bu sonuçlar bizim bulgularımızla farklılık göstermektedir. Ancak Malatya ve Malatya ağırlıklı bölgesel suşların değerlendirildiği ve 1 yıl ara ile yapılan iki çalışmada bile suş popülasyonunda farklılıkların tespit edilmesi hem tüberküloz toplum etkileşiminin son derece değişken olduğunu göstermekte hem de moleküler epidemiyolojik çalışmalara duyulan ihtiyacın gerekçesini ortaya koymaktadır. Ancak bölgeye ait aynı moleküler epidemiyolojik yöntemlerin kullanıldığı bu 4 çalışmanın bir başka önemli çıktısı Malatya bölgesi sonuçları arasında Beijing suşlarının % 0,9 oranında bildirilmiş olmasına karşılık, Çukurova bölgesi illeri olarak kabul edilebilecek Adana, Mersin, Hatay, Osmaniye, Gaziantep ve Kahramanmaraş illeri izolatları arasında Beijing ailesine ait suşların olmamasıdır. Ancak bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz Urfa iline ait izolatlar arasında % 8,4 oranında Beijing suşunun bulunması aslında bu suşların Urfa ve Malatya gibi Güneydoğu Anadolu illerinde bulunduğunu ancak bölgemize henüz girmediklerini göstermesi açısından önemlidir.

Çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis* Beijing genotipinin bölgemizde görülmemiş olmasına rağmen ülkemize girmiş olduğu Köksalan OK. ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan çalışmada da ortaya konmuştur. Bu grup, bizim çalışmamıza benzer şekilde Spoligotyping ve 12 lokus MIRU-VNTR metodu kombinasyonunu uygulayarak 4069 izolatı değerlendirdikleri çalışmalarında İstanbul bölgesi izolatlarında Beijing ailesine ait genotiplerin sıklığını % 1,1 olarak tespit etmiştir³¹. Bu oran bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz % 1,28' lik oranımız ile büyük benzerlik göstermektedir. Ancak bizim çalışmamızda Beijing ailesine ait izolatlarımızın tamamın Urfa iline ait

izolatlardır. Bu bakış açısı ile değerlendirildiğinde, gerçek anlamda Urfa bölgesi isolatları arasında Beijing ailesi suşların görülme sıklığı % 8,4'dür. Yani Beijing suşları Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerimizde daha yüksek oranlarda görülmektedir. Bu bulguda Çukurova bölgesinin *M. tuberculosis* Beijing suşları yönünden ne kadar ciddi bir risk ile karşı karşıya olduğunu ve moleküler bazlı çalışmaların bölgemiz açısından, bu suşların hareketlerini takip için ne kadar büyük önem arz ettiğini gösterir.

Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada Aktaş E. ve arkadaşları (2008) Zonguldak ilinde izole edilen 128 *M. tuberculosis* suşunu Spoligotyping ve MIRU-VNTR metodu ile değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada; kümeleşme oranı % 73 olarak bulunmuş, 94 izolatin 2-25 suş içeren 13 küme içerisinde toplandıkları, 34 (% 26,5) suşun ise tek üyeli özel kümeler oluşturdukları bildirilmiştir¹⁰⁰. Bu grup Durmaz R. ile Zozio T. ve arkadaşları gibi LAM7 TUR ailesine ait suşların % 19,5 ile en sık karşılaşılan suşlar olduklarını tespit etmişlerdir. Glynn JR. ve arkadaşları da 2006 yılında Beijing genotipinin araştırılması amacıyla Amerika'da yapmış oldukları ve ülkemiz dahil olmak üzere 35 ülkeden 49 araştırma merkezinden toplanan 29,259 klinik izolatin Spoligotyping metodu ile değerlendirdikleri çalışmalarında, ülkemize ait 620 izolat içerisinde Beijing/W oranını % 1 olarak tespit etmişlerdir¹⁰¹.

Bizim çalışmamız da dahil bölgemiz ve ülkemiz isolatları ile yapılan bu 5 çalışmanın sonuçları kıyaslandığında, bölgemizdeki *M. tuberculosis* genotiplerinin görülme sıklıklarının, LAM7 TUR ve T ailesi arasında değişmekle birlikte, birbirlerine benzerliği en dikkat çekici çıktıdır. Ancak bizim % 95'lik kümeleşme oranımız bu beş çalışmada elde edilen kümeleşme oranlarından daha yüksektir. Bu bizim kullandığımız tiplendirme programının, kitin ve enzim substrat sisteminin farklılığı ile izah edilebilir. Yine ülkemizde özellikle Doğu Anadolu bölgesinde Beijing ailesine ait suşların görülmeye başladığı ve kontrol programlarının bu tehdit dikkate alınarak revize edilmesi gerektiği ortaya konmuştur.

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 467 örnek MTK'nin epidemiyolojik özelliklerini tespit amacı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda;

- a) Bölgemiz genelinde, ülkemizden yapılan çeşitli bildirimlerden farklı olarak LAM7 TUR yerine T1 ailesine ait suşların yoğun görüldüğü,
- b) Çoklu ilaç direnci ile özdeşleşen Beijing grubunun daha önceden yapılan çalışmalarda da bildirildiği gibi Urfa ilinde sınırlı olduğu ve komşu illere taşınmadığı,
- c) Spoligotyping yöntemi ile suşların % 94,9' unun tanımlanmasına karşılık 24 (% 5,1) suşun tiplendirilemediği,
- d) Bu suşların daha önce tanımlanmamış bölgesel suşlar olabilecekleri var sayılarak ileri identifikasyon için dizi analizi yöntemi ile yeniden değerlendirilmelerinin uygun olacağı
- e) MIRU-VNTR'nin Spoligotyping yöntemine göre daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu ve spoligotipleme ile elde edilen grupları kendi içerisinde alt gruplara böldüğü, T1 grubu içerisinde 7 MIRU-VNTR alt grubu oluştuğu ve bu alt grupların bölgesel farklılıklar gösterdikleri görülmüştür. Örneğin T1 ailesi içerisinde tanımlanan ve bir tanesi 1 yıl diğeri ise 9 ay aralıklarla alınmış 2 hastaya ait örneklerden (1539-1392 ve 1086-1390) elde edilen izolatların aynı MIRU-VNTR profili verdiği ve bunun reaktivasyona işaret ettiği
- f) Spoligotiplemenin büyük bölgesel epidemilerde MTK'nin bölge içerisindeki hareketini gösterdiği, bu özelliği ile korunma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve uygulanan stratejilerin başarılarını belirlemede son derece yararlı olduğu,
- g) MIRU-VNTR ile kombine edilmeleri halinde epidemiyolojik yönden daha detaylı ancak küçük ölçekli projeksiyonların yapılmasına imkan sağlayacağı ,

- h) Tedavi başarısızlıklarının reinfeksiyon mu yoksa reaktivasyon mu olduğunun belirlenmesinde son derece yararlı olduğu
- 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- <http://www.who.int/tb/publications/globalreport/2006/pdf/fullreportcorrectedversion.pdf>.
- 2- **Peterson R.** Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *Karolinska Institutet*, Sweden, **2009**.
- 3- **Esen N.** Tüberkülozda Mikobakteriyel Persistans Mekanizmaları. 4.Tüberküloz Sempozyumu Kitabı, Malatya, **2005**; 58-64.
- 4- **Otal I, Martin C, Thierry D, Gicquel B.** Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol*, **1991**; 29(6): 1252–1254.
- 5- **Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM.** DNA Fingerprinting of *Mycobacterium bovis* Strains by Restriction Fragment Analysis and Hybridization with Insertion Elements IS1081 and IS6110. *Journal of Clinical Microbiology*, **1993**; 1143-1147.
- 6- **Kamerbeek J, Schouls L, van Soolingen D, van Embden J.** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, **1997**; 35(4): 907–914.
- 7- **Ahmed N, Hasnain SE.** Genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Old threats & new trends. *Indian J Med Res*, **2004**; 207-212.
- 8- **Kamerbeek J, L. Kolk SA, van Agterveld M, van Soolingen D, van Embden J.** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **1997**; 35:907–914.
- 9- **Burgos MV, Pym AS.** Molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J*, **2002**; 36, 54–65.
- 10- **Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V.** High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**; 1901–1906.
- 11- **Asgharzadeh M, Kafil HS.** Current trends in molecular epidemiology studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biotechnology and Molecular Biology*, **2007**; 108-115.
- 12- **Barış İY.** Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. *Toraks Dergisi*, **2002**; 3(3): 338-340.
- 13- **Barış İY.** Çağlar Boyu Tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 1-7.
- 14- **Samıç A, Çoban A.** Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı Kitabı. Samsun. **1999**.
- 15- **Barış Y.** Çağlar boyu tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. **2003**; 1-7.
- 16- **Karlıkaya C.** Tüberküloz Ders Notları. <http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdemot.htm>. **1998**.
- 17- **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**; 32(6):544-52.

- 36- **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.
- 37- **Andersen P, Munk ME, Pollock JM**, Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, **2000**; 356: 1099-104.
- 38- **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**.
- 39- **Özbal Y**. Tüberküloz immünolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi*, **2006**; 28 (1): 25-34.
- 40- **Babacan F, Över U**. Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* complex, In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, **2002**; 538-591.
- 41- **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.
- 42- **Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia EM**. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol*. **2001**; 166(12):7033-41.
- 43- **Thurnher M, Ramoner R, Gastl G, Radmayr C, Bock G, Herold M, Klocker H, Bartsch G**. Bacillus Calmette-Guerin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *Int. J. Cancer*, **1997**; 70:128-134.
- 44- **Öztürk R**. Tüberkülozda doğal direnç ve risk faktörleri. *21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı*, Samsun, **2003**; 58-73.
- 45- **Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I**. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun*, **1991**; 59 : 1905-10.
- 46- **Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibile JC**. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1989**; 86 : 2453-7.
- 47- **Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR**. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun*, **1991**; 59: 1755-61.
- 48- **Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V**: Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**; 102:4033-4038.
- 49- **Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, Klebl B, Thompson C, Bacher G, Pieters J**: Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*, **2004**; 304:1800-1804.
- 50- **Goren MB, Hart PD, Young MR, Armstrong JA**. Prevention of phagosome lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1976**; 73 : 2510-4.
- 51- **Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR. Jr**: SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, **2003**; 48:453-464.

- 52- **Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR.** Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, **2004**; 51:359-370.
- 53- **Smith CV, Huang CC, Miczak A.** Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, **2003**; 278:1735-1743.
- 54- **Geisel RE, Sakamoto K, Russell DG, Rhoades ER.** In vivo activity of released cell wall lipids of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin is due principally to trehalose mycolates. *J Immunol*, **2005**; 174:5007-5015.
- 55- www.rshm.gov.tr. *Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı* kitabı. **2010**.
- 56- **Kocabaş A.** Akciğer tüberkülozu In: Topçu Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, (ed). *İnfeksiyon Hastalıkları* 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **1996**; 396-443.
- 57- **Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A.** How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol*, **2006**; 8(11):1687-96.
- 58- **Ernst, J. D.** Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun*, **1998**, 66:1277–1281.
- 59- **Pieters J.** Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect.* **2001**; 3(3):249-55.
- 60- **Gatfield J, Pieters J.** Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, **2000**; 288(5471):1647-50.
- 61- **Sayama K, Diehn M, Matsuda K, Lunderius C, Tsai M, Tam SY, Botstein D, Brown PO, Galli SJ.** Transcriptional response of human mast cells stimulated via the Fc(epsilon)RI and identification of mast cells as a source of IL-11. *BMC Immunol*, **2002**; 12:3-5.
- 62- **Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G, Kerjaschki D, Maurer D.** Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med*, **2001**; 194(6):797-808.
- 63- **Gumperz JE, Brenner MB.** CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol*. **2001**; 13(4):471-8.
- 64- **Vankayalapati R, Klucar P, Wizel B, Weis SE, Samten B, Safi H, Shams H, Barnes PF.** NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol*. **2004**; 172(1):130-7.
- 65- **Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Safi H, Lakey DL, Mandelboim O, Samten B, Porgador A, Barnes PF.** The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol*. **2002**; 168(7):3451-7.
- 66- **Bals R.** Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*, **2000**; 1:141-50.
- 67- **Ganz T.** Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, **2003**; 3: 710-20.
- 68- **Raja A.** Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*. **2004**; 120(4):213-32.

- 69- **Abebe F, Holm-Hansen C, Wiker HG, Bjune G.** Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol.* **2007**; 66(2-3):176-91.
- 70- **Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR.** Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* **1998**; 160(11):5448-54.
- 71- **Barcelos W, Martins-Filho OA, Guimaraes TM, Oliveira MH, Spindola-de-Miranda S, Carvalho BN, Toledo VP.** Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping in pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. *Microbiol Immunol.* **2006**; 50(8):597-605.
- 72- **Liu G, Ren H, Sun XJ, Shi JS.** Distribution of natural killer cells and T-lymphocyte subsets in peripheral blood, gallbladder cancer and surrounding tissue. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* **2007**; 6(1):81-6.
- 73- **Çilli A.** Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 163-172.
- 74- **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**.
- 75- **Kiraz N.** Antitüberküloz İlaçlara Direnç Mekanizmaları ve Yeni İlaçlar, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 173-177.
- 76- **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.
- 77- **Durmaz R.** *Mycobacterium tuberculosis*'de Direnç Sorunu. *ANKEM Dergisi*, **2005**; 19 (2): 107-110.
- 78- **Fattorini L, Migliori BG, Cassone A.** Extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis: an old and new threat. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, **2007**; 43(4): 317-319.
- 79- **Tansel Ö.** Klasik Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 347-351.
- 80- Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing WHO Report 2008. WHO/HTM/2008; 93.
- 81- T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı: Türkiye'de Verem Savaşı 2009 Raporu. Ankara. **2009**.
- 82- **Bass JB.** *Epidemiology of Tuberculosis*. www.uptodate.com/subscribers/index.asp.
- 83- **Özkara S, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H.** Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı, Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı, **2003**.
- 84- **Zozio T, Allix C, Gunal S, Saribas Z, Alp A, Durmaz R, Fauville M, Rastogi, N. Sola, C.** Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Two cities of Turkey: Description of a New Family of Genotypes That is Phylogeographically Specific for Asia Minor. *BMC Microbiology*, **2005**; 5-44 .

- 85- **Günel S.** Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının IS6110RFLP (restriction fragment length polymorphism) ve spoligotyping profillerinin belirlenmesi. doktora tezi. Malatya, **2006**.
- 86- **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**, p. 4027-4035, Vol. 45.
- 87- www.pasteur-guadeloupe.fr
- 88- www.isogen-lifescience.com
- 89- **Caugant DA** (ed.), Molecular Epidemiology of Microorganisms, *Methods in Molecular Biology*, **2009**. Vol. 551- 10.1007/978-1-60327-999-4.
- 90- www.cdc.gov
- 91- **Smittipat N.** Three-year population-based evaluation of standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *JCM*. **2005**; 43:5034-43.
- 92- **Niemann S, Diel R, Khechinashvili G, Gegia M, Mdivani N, Tang YW.** *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage favors the spread of multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia. *J. Clin Microbiol*. **2010**;48(10):3544-50.
- 93- **Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, Hughes S, R. Hewinson G, Neill S.** Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*, **2002**; 148: 519–528.
- 94- **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. *J Clin Microbiol*, **2005**;1617–1624.
- 95- **Asiimwe BB, Ghebremichael S, Kallenius G, Koivula T, Joloba ML.** *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes and drug susceptibility pattern of isolates from tuberculosis patients in peri-urban Kampala, Uganda. *BMC Infectious Diseases*, **2008**; 8:101.
- 96- **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. *Journal of Clinical Microbiology*, **2010**; 448–455.
- 97- **Valcheva V, Mokrousov I, Narvskaya O, Rastogi N, Markova N.,** Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. *J Clin Microbiol*. **2008**;46(9):3005-11.
- 98- **Gencer B, Shinnick TM.** Molecular Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Turkey. *Am. J Infec Dis*, **2005**;(1), 5-11.
- 99- **Rohani M, Farnia P, Nasab MN, Moniri R, Torfeh M, Amiri MM.** Beijing genotype and other predominant *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes observed in Mashhad city, Iran. *Indian J Med Microbiol*, **2009**;27:306-10.
- 100- **Aktas E, Zozio T, Cömert FB, Külah C, Aydın O, Rastogi N, Sola C.** A first insight into the genetic diversity and population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Zonguldak, Turkey. *Clinical Microbiology and Infection*, **2007**;14-15.

- 101- **Glynn J.R.** Beijing/W Genotype *M.tuberculosis* and Drug Resistance European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques fertine Epidemiology and Control of tuberculosis. *Emerg. Infect. Dis*, 2006; 736-747.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ülkü ORAL ZEYTİNLİ
Doğum Tarihi ve Yeri : 13.11.1976, Anamur
Medeni Durumu : Evli
Adres : Kurtuluş Mahallesi Atatürk Caddesi No: 121
Arife Pusat Apartmanı Kat:7 No:13
Seyhan/ADANA
Telefon : 0 532 784 76 53
Faks :-
E-posta : zy.ulku@hotmail.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Varsa Mezuniyet Derecesi :-
Görev Yerleri : Devlet Hava Meydanları İşletmeleri (DHMI)
Adana Havalimanı
Dernek Üyelikleri : KLİMUD
Alınan Burslar : Yok
Yabancı Dil(ler) :İngilizce
Diğer Hususlar :-