

İBRAHİM HALİL ŞAHİN	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DIYARBAKIR-2022
---------------------	------------------------------------	--------------	-----------------



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRİMER ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇLİ
MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS KOMPLEKS
İZOLATLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

İbrahim Halil ŞAHİN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nezahat AKPOLAT

DİYARBAKIR – 2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRİMER ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇLİ
MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS KOMPLEKS
İZOLATLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

İbrahim Halil ŞAHİN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nezahat AKPOLAT

DİYARBAKIR – 2022
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOKTORA TEZİ
ONAY**

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı** Doktora öğrencisi **İbrahim Halil ŞAHİN**'in hazırladığı “**Primer Antitüberküloz İlaçlara Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleks İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Genotiplendirilmesi**” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman _____

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı		_____
Üye		_____
Üye		_____
Üye		_____
Üye		_____

Tarih:/.../2022

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../2022

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

...../2022

İbrahim Halil ŞAHİN

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi değerli danışman hocam Prof. Dr.Nezahat AKPOLAT'a yol göstericiliği, motive edici yaklaşımı ve sonsuz desteği için teşekkür ederim. Ayrıca bu uzun ve zorlu süreçte bana her zaman destek olan değerli hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mahmut METE'ye ve Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda desteğini gördüğüm, tez çalışmalarımın büyük bir titizlikle yürütülmesini sağlayan, beraber çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a ve öğrenimim süresince bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, her konuda rahatlıkla ulaşip danıştığım Dr.Öğr.Üyesi Nida ÖZCAN'a doktora eğitimim süresince vermiş oldukları değerli desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve her konuda bana destek olan Sayın Dr. Öğr.Üyesi Gülfer YAKICI'ya teşekkür ederim.

Gösterdikleri fedakârlık ve hoşgörü ile bugünlere gelmemi sağlayan, koşulsuz desteklerini hep arkamda hissettiğim annem ve babam başta olmak üzere tüm aileme teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her alanında bana destek olan, en zor günlerimde yanımda olan, biricik eşim Ayşe ŞAHİN'e zorlu doktora eğiminin sürecinde gösterdiği sınırsız anlayış, sevgi ve gösterdiği büyük fedakârlıklar için teşekkür ederim.

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TIP.20.004 numaralı proje ile desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
KISALTMALAR ve SİMGELER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
1. ÖZET.....	1
1.1. Türkçe Özet.....	1
1.2. Abstract	3
2. GİRİŞ ve AMAÇ	5
3. GENEL BİLGİLER	9
3.1. Tüberkülozun Tarihçesi.....	9
3.2. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	13
3.2.1. Mikobakterilerde hücre duvar yapısı.....	13
3.3. Mikobakterilerde Üreme Özellikleri	14
3.4. M. Tuberculosis Genom Özellikleri.....	15
3.5. Mikobakterilerin Sınıflandırılması	15
3.5.1. Fenotipik özelliklerine göre sınıflandırma	16
3.5.2. Genotipik özelliklerine göre sınıflandırma	17
3.6. Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz Epidemiyolojisi	19
3.7. Antitüberküloz İlaçların Etki ve Direnç Mekanizmaları	26
3.7.1. Primer antitüberküloz ilaçlar	26
3.7.1.1. Streptomisin	26
3.7.1.2. İzoniazid (INH)	27
3.7.1.3. Rifampisin	28
3.7.1.4. Ethambutol	29
3.7.1.5. Pyranizamid.....	30
3.7.2. İkinci seçenek ilaçlar	31
3.7.2.1. Florokinolonlar.....	31
3.7.2.2. Kanamisin, kapreomisin, amikasin, viomisin	32

3.7.2.3. Ethionamide	32
3.7.2.4. Para-amino salisilik asit (PAS)	32
3.7.2.5. Sikloserin	32
3.7.2.6. Makrolidler.....	32
3.7.3. Yeni anti-TB ilaçları	33
3.7.3.1. Bedakuilin	33
3.7.3.2. Delamanid	33
3.8. İlaç Duyarlılığının Belirlenmesi.....	33
3.8.1. İlaç duyarlılık testleri	34
3.8.1.1. Kültüre dayalı yöntemler.....	34
3.8.1.2. Hızlı duyarlılık testleri	35
3.8.1.3. Floresan kültür sistemi (BACTEC) Mycobacterium Growth Indicator Tube [MGIT] System 960	36
3.8.1.4. Moleküler yöntemler.....	37
3.8.1.5. Line prob assay (LPA)	38
3.8.1.6. GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Germany) testi	39
3.8.1.7. GeneXpert MTB/RIF assay(Cepheid, California, USA)	40
3.8.2. Genom dizi analizi yöntemleri	41
3.8.3. Moleküler epidemiyoloji.....	45
3.8.4. M. tuberculosis kompleksinin genotiplenmesinde kullanılan moleküler yöntemler.....	45
3.8.4.1. RFLP	45
3.8.4.2. Spoligotiplleme	47
3.8.4.3. MIRU-VNTR	49
3.8.4.5. SNP analizi.....	51
4. GEREÇ ve YÖNTEM.....	52
4.1. Örneklerin Toplanması.....	52
4.2. Moleküler Yöntemler için Genomik DNA İzolasyonu	52
4.2.1. Spoligotiplleme ve MIRU-VNTR genotiplendirme yöntemleri için genomik DNA İzolasyonu.....	52
4.2.2. GenoType MTBDRplus genotipik direnç analizi için DNA İzolasyonu .	53

4.3. İzole edilen DNA'ların Spoligotipleme, MIRU-VNTR ve GenoType MTBDRplus ile Analizleri	53
4.3.1. Spoligotipleme	53
4.3.2. MIRU-VNTR	54
4.3.2.1. PCR primer dizileri ve amplifikasyon aşamaları	55
4.3.3. GenoType MTBDRplus genotipik direnç analizi	57
5. BULGULAR	58
6. TARTIŞMA	68
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	77
8. KAYNAKLAR.....	79
9. ÖZGEÇMİŞ	100
10. EKLER.....	101
10.1. Etik Kurul Kararı.....	101
10.2. İntihal Raporu.....	102
10.3. Makale.....	103

KISALTMALAR ve SİMGELER

ARB	: Aside dirençli (resistant) basil
BCG	: Bacillus Calmette Guerin
CRISPR	: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats- Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri
ÇİD-TB	: Çoklu İlaç Dirençli Tüberküloz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR	: Direct Repeat
DGT-DOTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejileri
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EMB	: Etambutol
ETR	: Exact Tandem Repeat
EZN	: Erlich Ziehl Nelsen
GI	: Üreme İndeksi
HIV	: Human Immune Deficiency Virus
Hsp	: Heat Shock Protein-Isı Şok Proteini
INH	: İzoniazid
INF	: İnterferon
IS	: Insertion Sequence
MDR-TB	: Multi Drug-Resistant Tuberculosis-Çok İlaç Dirençli Tüberküloz
MGIT	: Mycobacterium Growth Indicator Tube
MIRU	: Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit
MTB	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

MTBK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks
FDA	: Next Generation Sequencing -Yeni nesil dizileme
OADC	: Oleik asit, Albümin, Dekstroz ve Katalaz
PCR	: Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPD	: Purified Protein Derivative-Saflaştırılmış protein derivesi
RD-TB	: Rifampisin Dirençli Tüberküloz
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF	: Rifampisin
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
STR	: Streptomisin
TB	: Tüberküloz
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeat
XDR-TB	: Extensively Drug-Resistant Tuberculosis
YİD-TB	: Yaygın ilaç dirençli Tüberküloz

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Belirli soylarda ardışık DNA kaybını gösteren tüberküloz basilinin önerilen evrimsel şeması.....	18
Şekil 2. MTBK üyelerinin genom çalışmalarına dayalı filogenetik soyları	19
Şekil 3. Vaka sayısı açısından ilk sekiz sırada yer alan ve 2020'deki küresel vakaların üçte ikisini oluşturan sekiz ülke	22
Şekil 4. 2020 yılı Tahmini TB insidans oranları.....	22
Şekil 5. HIV negatif kişilerde 2020 yılı tahmini TB ölüm oranları	23
Şekil 6. İNNO lipa test stribi	39
Şekil 7. Genotip MTBDRplus rpoB geninin Rifampisin direncinden sorumlu bölgelerin tespitinde kullanılan proplar	40
Şekil 8. MTBDRplus strip görüntüsü ve hibridizasyon sonrası direnç analizi.....	40
Şekil 9. GeneXpert prob hedef dizileri	41
Şekil 10. WGS yönteminin <i>M.tuberculosis</i> ile ilgili kullanım alanları.....	42
Şekil 11. CRISPR bölgesinin DNA dizisine türler özgü spacer bölgeleri	48
Şekil 12. <i>M.tuberculosis</i> 'in VNTR tipnedirme prensibi	50
Şekil 13. Spoligotip ailelerinin ikamet adreslerine göre Dağılımları	64
Şekil 14. MIRU-VNTR PCR jel görüntüsü	65
Şekil 15. İzolatların filogenetik ağaç ile ilişkilendirilmesi	67

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. <i>M.tuberculosis</i> 'in laboratuvar tanısında kullanılan DSÖ tarafından onaylanmış moleküler ticari testler	44
Tablo 2. 15 lokus MIRU-VNTR yönteminde kullanılan primerler	55
Tablo 3. MIRU-VNTR PCR aşamasında kullanılan malzemeler ve miktarları	56
Tablo 4. VNTR bölgelerine spesifik Amplifikasyon aşamaları	56
Tablo 5. MIRU-VNTR yönteminde kopya sayılarına göre PCR ürünü bant büyüklükleri	56
Tablo 6. GenoType MTBDR _{plus} Amplifikasyon aşamaları	57
Tablo 7. Hastalara ait izolatların ikamet adreslerine göre dağılımları	58
Tablo 8. Hastalara ait izolatların direnç profillerine göre dağılımları	59
Tablo 9. İzolatların direnç profillerinin hasta ikametlerine göre dağılımları	60
Tablo 10. İzolatlarımızın izole edildikleri hasta cinsiyetleri ve yıllara göre dağılımları	60
Tablo 11. Dirençli izolatların yayma sonuçlarının yıllara göre dağılımları	61
Tablo 12. Dirençli izolatlara ait moleküler direnç mekanizmaları ve dağılımları.....	62
Tablo 13. İzolatların Spoligotip Profil ve Genotip Dağılımları.....	63
Tablo 14. Spoligotip Ailelerinin Direnç Profillerine Göre Dağılımları	65

Primer Antitüberküloz İlaçlara Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleks İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Genotiplendirilmesi

Öğrencinin Adı ve Soyadı: İbrahim Halil ŞAHİN

Danışman: Prof. Dr. Nezahat AKPOLAT

Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji AD

1. ÖZET

1.1. Türkçe Özet

Amaç: Fenotipik olarak primer anti-tüberküloz ilaçlara dirençli olduğu saptanan *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) izolatlarının spoligotipleme, MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units –Variable Number of Tandem Repeats) yöntemleriyle genotiplendirilmesi ve dirence neden olan mutasyonların tespit edilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Ocak 2014-Ağustos 2019 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Hastanesi Laboratuvarı Mikobakteriyoloji biriminde klinik materyallerden izole edilen ve MGIT 960 sistemi ile primer antitüberküloz ilaçlara dirençli olduğu saptanan MTBK izolatları dahil edildi. Toplam 69 izolatın 32'si (%46.4) çoklu ilaç dirençli (ÇİD), 34'ü (%49.3) izoniazid (INH) ile birlikte primer anti-tüberküloz ajanlardan bir veya birkaçına, üçü (%4.3) ise rifampine (RIF) dirençliydi. İzolatlar spoligotipleme ve 15 lokus MIRU-VNTR yöntemleri ile genotipik çeşitlilik ve klonal ilişkiler yönünden değerlendirildi, GenoType MTBDR plus (Hain Lifescience, Almanya) kiti ile dirençle ilişkili gen mutasyonları saptandı.

Bulgular: Spoligotipleme sonucu en çok üyeye sahip aileler T1 (%55.4) ile TUR (%13.8) idi. İzolatların yaklaşık üçte biri (%36.92) T1 ailesinin SIT53'ünde, %9.23'ü SIT284, %12.31'i SIT41'de ve %0.77'si herhangi bir aileye dahil olmayan spoligotip SIT2560'ta kümelendi. Yedi izolat SIT2560, birer izolat SIT4, SIT608 ve bir izolat da orphan suş olarak tanımlandı.

RIF dirençli izolatların 19'unda (%57.6) saptanan, *rpoB* geninin 531. Gen bölgesindeki TCG/TTG mutasyonu dirençten sorumlu en yaygın mutasyondur. INH dirençli izolatların 14'ünde (%46.7) *katG315* gen bölgesinde AGC/ACC mutasyonu,

8'inde (%26.7) ise inhA gen bölgesinin -15 pozisyonunda C/T mutasyonları saptandı.

Sonuç: İzolatlarımızın kümелendiği majör familyaların %55.4 ile T1 ve %13.8 ile TUR olduğu, saptanan kümelerin genellikle farklı illerden gelen hastalara ait karışık izolatlardan oluştuğu ve aralarında klonal ilişki bulunmadığı, dirençli izolatların literatürde belirtilen yaygın mutasyonlar gösterdikleri saptandı.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, ilaç direnci, genotipleme teknikleri



Genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex isolates resistant to primary antituberculosis drugs by molecular methods

Student's Surname and Name: ŞAHİN Halil İbrahim

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Nezahat AKPOLAT

Department: Medical Microbiology

1.2. Abstract

Aim: Genotype determination of Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) isolates, which were phenotypically resistant to primary anti-tuberculosis drugs, by spoligotyping and Mycobacterial interspersed repetitive units, (MIRU) - variable number of tandem repeat (VNTR) typing methods was aimed.

Materials and Methods: MTBC strains isolated from clinical materials in Dicle University Hospital Laboratory Mycobacteriology unit and found to be resistant to primary antituberculosis drugs with the MGIT 960 system between January 2014 and August 2019 were included. Of the 69 isolates, 32 (46.4%) were multi-drug resistant (MDR), 34 (49.3%) were resistant to one or more of the primary anti-tuberculosis agents in addition to isoniazid (INH), and three (4.3%) were resistant to rifampin (RIF). Isolates were evaluated in terms of genotypic diversity and clonal associations by spoligotyping and 15 loci MIRU-VNTR methods. Resistance genes were determined by GenoType MTBDR plus (Hain Lifescience, Germany).

Results: Families with the highest number of members by spoligotyping were T1 (55.4%) and TUR (13.8%). Approximately one-third (36.92%) of the isolates clustered in SIT53 of T1 family, 9.23% in SIT284, 12.31% in SIT41, and 0.77% in the spoligotype SIT2560, which was not included in any family. Seven isolates were identified as SIT2560, one isolate SIT4, SIT608 and orphan strain.

TCG/TTG mutation in the 531st gene region of the rpoB gene, found in 19 (57.6%) of the RIF resistant isolates, was the most detected mutation responsible for resistance. AGC/ACC mutations were found in the katG315 gene region in 14 (46.7%) of the INH resistant isolates, and C/T mutations were detected in the -15 position of the inhA gene region in 8 (26.7%) of the INH resistant isolates.

Conclusion: The major families in which our isolates clustered were T1 with 55.4% and TUR with 13.8%, the clusters determined were generally mixed isolates from

patients from different provinces and there was no clonal relationship between them, and resistant isolates showed common mutations stated in the literature.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, genotyping techniques



2. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanlık tarihi üzerinde önemli bir etkiye sahip olan tüberküloz (TB), tarih boyunca yol açtığı salgınlarla insanlık tarihine çarpıcı bir biçimde damgasını vurduğu gibi günümüzde de en ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. Etiyolojik ajanı henüz bilinmeden, tüketim hastalığı, phthisis, scrofula, pott hastalığı veya beyaz ölüm olarak adlandırılan TB, akciğer dokusunda, lenf nodlarında veya vücudun diğer organlarında progresif granülomatöz veya tüberkül gelişimi ile karakterize bir bakteriyel enfeksiyondur. Tüberküloza, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBK) olarak bilinen ve %99 oranında genom benzerliği gösteren, filogenetik olarak yakından ilişkili bir grup aside dirençli bakteri(ARB) neden olmaktadır(1).

Dünya nüfusunun dörtte birinin MTBK üyeleri ile enfekte olduğu ve bu kişilerin aktif tüberküloz gelişimi için on yıllarca sürecektir büyük bir kaynak oluşturduğu tahmin edilmektedir(2,3,4). Kadınlara oranla erkeklerde biraz daha fazla görülmesine rağmen yaş ve cinsiyetten bağımsız olarak toplumdaki tüm bireyleri etkileyebilme potansiyeline sahip olan TB, tek bir bulaşıcı ajandan kaynaklanan küresel ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir(3).

Bir yoksulluk hastalığı prototipi olan TB'nin gelişimi ve yayılması için bilinen sosyo-ekonomik ve çevresel risk faktörlerine ek olarak, İnsan İmmün yetmezlik virüsü/Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu (HIV/AIDS) ve özellikle 1940'lı yıllarda başlayan kemoterapide kullanılan antitüberküloz ilaçlara karşı, MTBK suşlarında intrinsik biyolojik faktörlere bağlı olarak var olan ilaç direncine ek olarak kazanılmış direnç de ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu predispozan faktörler, tüberküloza karşı verilen mücadelenin başarıya ulaşmasını zorlaştırdığı gibi, günümüzde çoklu ilaç direncinin de ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır. Özellikle TB tedavisinde kullanılan birinci seçenek antitüberküloz ilaçlardan izoniazid ve rifampisine karşı çoklu ilaç dirençli (ÇİD-TB, Multi Drug Resistance Tuberculosis / MDR-TB), ve yaygın ilaç dirençli (YİD-TB, Extensively drug resistance Tuberculosis /XDR-TB), olarak adlandırılan, rifampisinin yanı sıra herhangi bir florokinolon grubu antibiyotik ile bedakuilin veya linezolid ilaçlarından en az birine

dirençli MTBK suşlarının ortaya çıkması, post antibiyotik çağı başlatmış ve tedavi edilebilir ve önlenabilir bir enfeksiyonu yetersiz ve eksik tedavi uygulamalar sonucunda yaşamı tehdit eden hastalığa dönüştürmüş durumdadır(1,3,5).

Küresel olarak, son on yıldır tespit edilmiş olan yeni TB vakalarının içerisindeki ÇİD-TB veya rifampisine dirençli tüberküloz (RR-TB) vakalarının oranı %3-4 iken daha önce tedavi edilmiş kişiler arasında %18-21 düzeyinde olduğu rapor edilmiştir(3). Son küresel tahminler, 2020’de yaklaşık 350-400 bin yeni ÇİD veya RR-TB vakasının tespit edilebildiğini ve bunların küresel düzeyde yıllık antitüberküloz ilaca dirençli vakaların ancak %40’nı oluşturduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde ÇİD/RR-TB hastaları için uygulanan tedavi rejimleri, ilaca duyarlı TB vakalarındaki tedavi rejimleriyle karşılaştırıldığında, bu rejimlerin daha uzun süreli tedavi süreci gerektirmesi, daha yüksek toksisite profiline sahip ikinci seçenek ilaçların kullanımı ve bunun sonucunda hastalar üzerinde ciddi yan etkilere sahip olmaları, Bedaquilin ve linezolid gibi yeni antitüberküloz ilaçlar geliştirilmiş olursa da, uygulanan mevcut tedavi rejimlerinin tatmin edici olmaktan uzak olduğunu göstermektedir(3,6,7,8).

Günümüzde giderek artan oranda anti-TB ilaçlara dirençli suşların ortaya çıkması, muhtemelen küresel sağlığın karşı karşıya olduğu en derin zorluklardan birini oluşturmakta ve ilaçların artık etkili olmadığı bir çağa dönüş olasılığını artırdığı için de TB’nin kontrolünü ciddi şekilde tehdit etmektedir. Özellikle çoklu ilaç direnci geliştirme riski yüksek olan Çin kökenli Beijing suşlarının küresel çapta yayılması, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün tüberkülozu sonlandırma stratejisi, The End Tuberculosis Strategy, kapsamında 2015’e kıyasla 2020 yılı için belirlemiş olduğu TB insidansındaki %20’lik ve 2035 yılı için belirlemiş olduğu %90’lık azaltma hedefleri için uygulanan programların başarısını ciddi oranda tehdit etmektedir. Bu durumun aşılabilmesi ve uygulanan control programları için belirlenen hedeflere ulaşımabilmesi için, uygulanan TB kontrol programlarının gözden geçirilmesi ve tüberkülozun tanısı, tedavisi ve önlenmesine olanak sağlayacak daha özgül, duyarlı, hızlı ve maliyet-etkin modern araç ve yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir(3,6,9).

MTBK üyelerinden özellikle çoklu ilaç direnci gösteren izolatların yayılmasının engellenmesi, bu suşların tür tanımlanmalarının yapılmasını, ilaç direnç profillerinin belirlenmesini ve farklı hastalardan elde edilen klinik izolatlar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesini gerektirmektedir. Bu nedenle çoklu ilaca dirençli klinik izolatların taşınma zincirlerinin takip edilmesinde, evrimsel ilişkilerinin belirlenmesinde, direnç gelişimine zemin hazırlayan risk faktörlerinin tespitinde ve epidemiyolojik verilerin elde edilmesinde; koloni morfolojisi, üreme hızları, antibiyotik duyarlılıkları, faj tiplendirilmesi gibi geleneksel fenotipik süreyans araçları yerine TB gelişimine olanak sağlayan konakçı-patojen dinamiğini anlamamıza ve klinik izolatlar arasında filogenetik ilişkilerin belirlenmesini mümkün kılan moleküler yöntemlerin kullanılması zorunlu hale getirmiştir. Bu yöntemlerin kullanılması, tüberkülozun epidemiyolojisinin belirlenmesi amacına hizmet ettiği gibi DSÖ'nün küresel düzeyde TB eradikasyonu için uyguladığı programların başarıya ulaşmasına da olanak sağlayacaktır.

Moleküler yöntemlerin epidemiyolojik alana uygulanmasıyla klinik MTBK suşlarının genotiplendirilmesi, moleküler epidemiyoloji alanının önemli ölçüde gelişmesine olanak sağladığı gibi MTBK üyelerinin evrimsel tarihine ilişkin anlayışımızı büyük oranda değiştirmiş durumdadır. Ayrıca MTBK klinik izolatlarının genotiplendirilmesi, TB hastaları arasındaki olası epidemiyolojik bağlantıları göstererek, şüpheli salgınları ve laboratuvar çapraz kontaminasyonlarını saptaması, nüks vakalarda eksojen reinfeksiyonu ve endojen reaktivasyonunu birbirinden ayırt edilmesine olanak sağlaması, bu yöntemlerin TB'nin epidemiyolojik araştırmalarında geniş kullanım alanı bulmasını sağlamıştır(10).

Günümüzde MTBK üyelerinin tanımlanması ve filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla tüm genom dizileme (Whole genome sequence=WGS), Single nucleotide polymorphism (SNP), IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism (IS6110 RFLP), Spoligotiplendirme (Spacer oligonucleotide typing) ve Mycobacterial Interspersed Repetitive Units –Variable Number of Tandem Repeats (MIRU-VNTR) gibi birçok moleküler metot geliştirilmiştir. Mevcut yöntemlerden, tüberkülozun moleküler epidemiyolojik araştırmalarında en fazla kullanılanları, *M.tuberculosis*'in kromozomal DNA'sında dağılmış bir şekilde bulunan insertion sequence (IS) gibi mobil genetik elementlerin sayı ve

konumlarındaki değişkenliği saptayan parmak izi (fingerprint) tabanlı bir metot olan IS6110 RFLP metodu, hemen hemen tüm MTBK üyelerinde bulunan Direct-Variant Repeat (DvR) lokusları olarak adlandırılan belirli bir genomik bölgelerdeki polimorfizmleri hedef alan PCR tabanlı bir genotiplendirme metodu olan Spoligotiplendirme (Spacer oligonucleotide typing) metodu ve yine PCR tabanlı bir tiplendirme metodu olup intergenik bölgedeki değişken sayıda tekrar dizileri (VNTR) içeren çoklu genomik lokusların polimorfizmine dayanan MIRU-VNTR metotlarıdır. Bu metotlardan IS6110 RFLP tiplendirme metodu, uzun süre MTBK üyelerinin moleküler tiplendirilmesinde altın standart bir metot olarak kullanılmış olunmasına rağmen, yöntemin emek yoğun olmasının yanı sıra, kültür ve DNA saflaştırması için uzun zamana ihtiyaç göstermesi, elde edilen karmaşık bant profillerinin yorumlanmasındaki güçlükler ve nihayet IS6110 elementlerinin düşük kopya sayısı içeren izolatlarda ayırım gücünün düşük olması gibi dezavantajları sebebi ile, günümüzde tüberkülozun moleküler epidemiyolojik çalışmalarında, hızlı, tekrarlanabilir ve kolay uygulanabilir olan spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR metotlarının tek başına veya kombinasyonu daha yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmış ve IS6110 RFLP metodunun yerini almaya başlamışlardır(10,11,12,13).

Bu çalışmamızın temel amacı; bölgemizde tedaviye cevap vermeyen ve TB salgınları yönünden risk oluşturabilme potansiyeline sahip ÇİD-TB veya YİD-TB suşlarının, TB ön tanılı hasta klinik örneklerinden izole edilen genel MTBK izolatları arasındaki prevalansını ve bu suşların Spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemleri kullanılarak genotipik özelliklerini tespit etmek, suşlar arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek, anti-tüberküloz ajanlara karşı duyarlılık profilleri, direncin moleküler mekanizmaları ve direnç profilleri ile genotip özellikleri arasındaki muhtemel ilişkiyi araştırarak bölgemizde TB epidemiyolojisi ile ilgili prediktif veri oluşturmaktır.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Tüberkülozun Tarihçesi

Dünyadaki en ölümcül ama aynı zamanda tedavi edilebilir ve hatta önlenabilir hastalıklardan biri olan Tüberküloz (TB); muhtemelen bilinen insanlık tarihinden daha uzun bir geçmişe sahip olup, eski çağ antik enfeksiyon hastalıklarından biri olarak geçmişte olduğu gibi günümüzde de her yıl dünya çapında milyonlarca insanın ölümüne neden olmaktadır. Hastalığın etyolojik ajanının ortaya çıkması ve yayılması sosyal ve biyolojik faktörlerle yakından ilişkili olduğundan, muazzam sosyal ve ekonomik gelişmelere rağmen asırlardır dalgalanmalarla seyrettiği bilinen tüberküloz epidemilerinin meydana gelmesi, bu hastalığın tarihini, toplumların bilimsel, tıbbi, sosyal ve politik başarısızlığının tarihi olarak ele alınmasını gerektirmektedir.

Bir hipoteze göre; Mikobakterilerin yaklaşık olarak 150 milyon yıl önce yeryüzünde ortaya çıktığı iddia edilmekte ve bulundukları çevre şartları ve adapte oldukları konağın yapısına bağlı olarak 15-20 milyon yıl önce bir evrimsel süreç geçirip alt türlere ayrıldıkları düşünülmektedir(14,15).

Günümüzde Mikobakteri cinsi içerisinde 120'den fazla tür tanımlanmış olunmasına rağmen, bunların MTBK olarak sınıflandırılan ve konak tropizmi, patojeniteleri ve fenotipleri farklı olan çok az bir kısmı, vertebralılarda enfeksiyon etkeni olarak izole edilmişleridir(16).

İnsan tüberkülozu etkeni olan mikobakterilerin en eski tarihsel kanıtları, yaklaşık olarak MÖ 8000'e kadar eskiye dayanmaktadır(14). Vertebralıların fosillerindeki tanımlanmış olan TB kemik lezyonları, tüberkülozun etyolojik ajanı olan MTBK üyeleri ile insan konakçı arasında uzun süredir devam eden ilişkinin neolitik döneme kadar uzandığını göstermektedir(17). Yakın zamana kadar, insanlarda hastalığın, neolitik dönem gibi sosyal ve besinsel değişim dönemleri sırasında evcilleştirilmiş oldukları sığırlarda tüberküloz etkeni olan *M. bovis*'ten kökenlendiği bilimsel anlayışı hâkim olmuştur(18). Bununla birlikte, *M. tuberculosis*'in tüm genomu 1998'de dizinlendiğinde yeni, gözden geçirilmiş bir teori ortaya çıkmış ve yapılan

karşılaştırılmalı genom analizleri sonucunda, *M. bovis*'in *M. tuberculosis*'ten daha küçük bir kromozoma yapısına sahip olduğunu ve *M. tuberculosis*'in doğrudan bir sığır tüberkülozu etkeni olan *M. bovis*'ten evrimleşmesinin mümkün olmadığını göstermiştir(18). Bu evrim senaryosu daha sonra birçok başka çalışma tarafından da doğrulanmıştır(19,20,21,22). Yapılan genom dizilimi çalışmalarına dayanarak, *M. tuberculosis*'in yaklaşık 35.000 yıl önce ayrı bir patojen olarak var olduğu mantıklı görünmektedir. Bununla birlikte farklı çalışmalarda, MTBK tüm basillerinin atasının yaklaşık üç milyon yıl önce Doğu Afrika'da hominidleri enfekte etmiş olabileceği ve 20.000-15.000 yıl önce ilk defa modern *M. tuberculosis* türlerinin ortak atasının ortaya çıkmış olabileceği de varsayılmaktadır(23). Ayrıca bu basilinin tüm genom düzenlemesinin aydınlatılmasından bu yana geçen 20 yılda elde edilen bilgi birikimi, oldukça başarılı bir insan patojeni olan *M. tuberculosis*'in yeryüzünde ilk ortaya çıkışından etyolojik ajanı olduğu bilinen mevcut salgınlara kadar uzun bir geçmişi olduğunu da varsaymamızı sağlamıştır(24).

Milattan Önce, 2400'li yıllara kadar dayanan Mısır mumyalarında tüberküloza özgü Pott lezyonları ve benzer iskelet deformitelerinin varlığının, TB tarihi üzerinde çalışan araştırmacılar tarafından ortaya konulmuş olması, bu hastalığın eski Mısır döneminde de bilindiğini göstermektedir. Aynı zamanda benzer anormalliklerin erken Mısır sanatında açıkça gösterilmiş olması, spinal TB'nin muhtemelen MÖ 3500'e kadar var olduğunu ve TB'nin eski Mısır hanedanlarının erken ve geç dönemlerinde tanımlandığını göstermektedir. Bununla birlikte, Mısır papirüsünde TB lezyonları hakkında hiçbir kanıt bildirilmemiştir. TB'yi tanımlayan ilk yazılı belgeler sırasıyla MÖ 3300 ve 2300 yıllarda Hindistan ve Çin'de bulunmuştur (25)

Mısır'da olduğu gibi, Amerika'da da TB'nin çok eski çağlardan beri var olduğu ile ilgili arkeolojik kanıtlar bulunmuştur(26,27,28). Pott hastalığı da dâhil olmak üzere kemik tüberkülozu Mısır'da olduğu gibi Perulu mumyalarda da *M. tuberculosis* DNA'sı, mumyalanmış dokulardan çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir. Amerika'da Kolomb öncesi tüberkülozun tarihi And Bölgesinden görülen vakalara dayandırılrsa da , hastalığın yarıkürede ilk Avrupalı kâşiflerin gelişinden önce meydana geldiğine dair bol miktarda arkeolojik kanıt bulunmuştur(29).

Tarihsel süreç içerisinde farklı isimlerle anılan tüberküloz asırlar boyu birçok kişinin yaşamını sonlandırdığı için “Ölümün Kaptanı, Captain of the Death”, hastaları soldurarak yok ettiği için “Beyaz Ölüm White Death” veya “Beyaz Veba-White Plaque”, yakaladığı insanı eriterek öldürdüğü için “Tüketim Hastalığı, Consumption” adıyla tanımlanmıştır. Romalılar bu hastalığa hırıltılı nefes alıp verme ve öksürükle balgam atma anlamında “Phthisis” adını koymuşlardır. Bizim dilimizde ise “ince hastalık ” en çok kullanılan tanımıdır(30,31,32).

On dokuzuncu yüz yılda tüberkülozun Enfeksiyöz doğasının aydınlatılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Alman bir doktor olan Johann Lukas Schönlein, 1834'te ilk defa tüberküloz terimini hastalığı tarif ederken kullanmış ve Fransız askeri tıp okulunda bir cerrah olan Jean Antoine Villemin 1865'te hastalığın kışlalarda uzun süre kalan askerler arasında, sahadakilere göre daha sık görüldüğünü, ayrıca kırsal kesimden gelen sağlıklı askerlerin, hizmete başladıktan birkaç ay sonra hastalığın belirtilerini gösteren askerlerle aynı semptomları gösterdiklerini gözlemleyerek yaptığı çalışmalarla tüberkülozun bulaşıcı bir hastalık olduğunu bildirmiştir.(33)

Paul Ehrlich tarafından önerilen metilen mavisi boyasını modifiye ederek kullanan ünlü bilim adamı Dr. Robert Koch, TB'den ölen genç bir hastanın akciğerinden basili izole ederek, Ortaçağ Avrupa'sında kalıtsal bir hastalık olarak bilinen TB'nin etyolojik ajanını ilk defa izole etmeyi başarmıştır. Daha sonra bunu kültürde üretmiş ve tekrar deney hayvanlarına vererek TB oluşturmayı başarmıştır. Bulduğu bu etyolojik ajana *M. tuberculosis* ismini veren Dr. Robert Koch, 24 Mart 1882'de Berlin fizyoloji derneği toplantısında bu olağanüstü bulgularını sunmuş ve bu hastalıkla mücadele yolları hakkında beyanlarda bulunmuştur^(30, 34). Bu keşfi takip eden sonraki yıllarda, Pirquet ve Mantoux tüberkülin cilt testini, 1921 yılında ise Calmette ve Guérin de *M. bovis*'i yaklaşık 20 yıl süreyle 233 defa pasajlayarak, basilin zayıflatılmış formundan bir tüberküloz aşısı geliştirdiler. Hastalık yapma yeteneğini yitirmiş fakat canlı olan bu aşı kökenine Bacille Calmette-Guérin / BCG adı verilmiştir. İlk defa Paris'te başarılı aşı çalışmalarından sonra aşı, Avrupa ve ABD gibi dünyanın birçok ülkesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve zaman içerisinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir(30). Seibert ve Glenn(1939) old

tüberkülini saflaştırarak, saflaştırılmış bu protein derivesi (PPD)'yle TB varlığını tespit etmeye başlamıştır(35).

Jorgen Lehmann(1943) tarafından bulunan para-amino salisilik asit (PAS), tüberküloz tedavisinde kullanılan ilk kemoterapötik olup bakteriyostatik etkisi nedeniyle tedavide istenilen başarıyı sağlayamamıştır. Tüberküloz tedavisinde etkili ilk antibiyotik olan streptomycin'in 1944 yılında Amerika Birleşik devletlerinde toprak biyoloğu olan Selman Waksman tarafından bir *Actinomyces* türü bir mantardan izole edilmesi ve tüberküloz tedavisinde kullanılmasıyla bir dönüm noktası meydana gelmiştir. Ancak kemoterapide ilaçların tek başına kullanılmaları tüberküloz etkenlerinin kısa sürede direnç geliştirmesine neden olmuş ve tedavi umutlarının zayıflamasına neden olmuştur. Kısa bir süre sonra izoniazid'in tüberküloz basili üzerindeki etkisinin tespit edilmesiyle PAS, INH ve STR' den oluşan kombine ilaç tedavisi dönemi başlamış ve bu üç ilacın 18-24 ay süreyle devamlı olarak kullanılmasıyla tüberküloz hastalarının % 90-95'i tedavi edilebilir hale gelmiştir. Sonraki yıllarda pirazinamid (PZD), ethambutol (ETM) ve rifampisin (RIF)'in tedavide kullanılması, tüberküloz tedavisinde yeni umutların doğmasına neden olmuşsa da etyolojik ajanın bu ilaçlara karşı kısa süre içerisinde direnç geliştirmesi, yeni anti-tüberküloz ajanlarının geliştirilmesini zorunlu kılmıştır(36).

Yetmişli yıllarda Uygulanan tedavi yöntemleri ve aşılama programları sayesinde gelişmiş batı ülkelerinde tüberkülozun eradikasyonunun başarılmasına ramak kaldığı düşünülmeye başlanmış, bu durum ise tüberküloz kontrol programlarında gevşemelerin meydana gelmesine neden olmuştur. Ancak seksenli yıllarda AIDS(Acquired Immun Deficiency Syndrome)'in ortaya çıkması, ekonomik temelli sorunlar, artan kontrolsüz göçler, tüm dünyada olduğu gibi Avrupa'da da TB'nin insidansında artış meydana getirmiş olması nedeniyle, halk sağlığı otoritelerinin dikkatini yeniden üzerinde toplamaya başlamıştır(37). Ayrıca etyolojik ajanın giderek artan oranda anti-tüberküloz ilaçlara direnç kazanması ve çoklu ilaç dirençli /ÇİD-TB ile yaygın ilaç dirençli/YİD-TB suşların yaygınlaşması, tedavi seçeneklerini sınırlandırarak tehlikenin küresel bir boyut kazanmasına neden olmuştur. Bu durum DSÖ tarafından uzun yıllardır uygulanan tüberküloz Kontrol Programlarının yetersiz olduğunu ortaya koymuş ve DSÖ'nün TB Kontrol

Programlarının yeniden ve daha kapsamlı bir şekilde revize edilmesinin gerekliliğini ortaya çıkarmıştır(38,39).

3.2. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Mikobakteriler, spor oluşturmayan, hareketsiz, aerobik bakteriler olup, boyutları ve şekilleri üreme ortamına göre değişmekle birlikte 0,2-0,6x1-10 mikrometre boyutlarında, hafif kıvrık ya da düzgün basillerdir. Mikobakteriler, Genomik desoksiribonükleik asitlerinde(DNA) olağandışı bir şekilde yüksek bir guanin ve sitozin (G+C) içeriğine (%61-71 mol) ve bakteriler arasında hücre duvarlarında muhtemelen en yüksek lipid içeriğine sahip olup, *Actinomycetales* takımının *Mycobacteriaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmışlardır. Hücre duvarlarında peptidoglikan tabaka bulunması nedeniyle Gram(+) bakterilere benzerlik gösterirler de, bakteri duvarında bulunan hidrofobik lipid molekülleri nedeniyle dezenfektanlara ve yaygın laboratuvar boyalarına (anilin boyalar) karşı direnç gösterirler. Bu nedenle Anilin ve diğer bazı yoğun boyaları almaları için ya ısıtılarak boyanmaları ya da uzun süre boyaya maruz bırakılmaları gerekmektedir. Mikobakteriler Ziehl-Neelsen ya da Kinyoun boyama yöntemleri ile bir kez boyandıktan sonra, asit-alkolle muamele edildiklerinde boyayı bırakmadıklarından, aside dirençli bakteriler(ARB) olarak adlandırılırlar.(40,41)

Mikobakteriler ile diğer yakından ilişkili cinsler (*Corynebacterium*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Dietzia*) benzer hücre duvarı bileşiklerine ve yapılarına sahip olmaları nedeniyle bazı fenotipik benzerlikler göstermektedirler(42).

3.2.1. Mikobakterilerde hücre duvar yapısı

Mikobakterilerdeki hücre çeperinin olağan üstü karmaşıklığı, mikobakterileri diğer bakterilerden ayıran en temel özelliklerden biridir. Mikobakterilerdeki hücre duvarının yapısal özelliklerinin belirlenmesiyle ilgili çalışmalar, 1960 ve 1970'lerde başlatıldı. Uzun bir sessizlik döneminden sonra, NMR ve kütle spektral analizlerdeki gelişmeler ile *M.tuberculosis* genomunun aydınlatılması ile ilgili incelemeler, sadece mikobakteriyel hücre duvarı yapısının ve içerdiği lipidlerin yapısının değil, aynı zamanda bu süreçlerin genetik temeli ve biyosentez aşamalarını da anlamamızı sağlamıştır. *M.tuberculosis*'te, bakterinin hayatta kalması ve virülansı için hayati bir

öneme sahip, hidrofilik maddelere karşı bir geçirgenlik bariyeri oluşturan, lipid ve karbohidrat moleküllerinin yoğun olduğu, olağan dışı bir hücre duvar yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. Mikolil-arabinogalaktan peptidoglikan kompleksi olarak adlandırılan bu büyük makromoleküler yapılar ve fosfatidil-miyo-inositol bazlı lipoglikanlar, mikobakteriyel hücre duvarının temel özelliklerini belirlemektedir. Bugünkü bilgilerimize göre; üç tabakadan oluşmuş hücre duvarının en iç tabakasını bakteri hücre membranı oluşturmakta ve orta tabakanın iskeleti ise peptidoglikan ve arabinogalaktan oluşmaktadır. Peptidoglikan tabaka fosfodiester bağlarıyla Mycolylarabinogalaktan (mAG)'a kovalent olarak bağlanmış olup, Mycolylarabinogalaktan (mAG) da hücre zarına dikey doğrultuda dallanmış mikolik asitlere bağlanmıştır. Bu mikolik asitler, *M. tuberculosis*'in birçok fizyolojik ve virülansından sorumlu gerçekten özel bir lipid bariyeri sağlamaktadır. Bakteri duvarında mikolik asitlerden başka çok fazla sayıda lipid, glikolipid ve peptidoglikolipid bulunmaktadır. Bu maddeler bakteri duvar ağırlığının yaklaşık olarak %60-65'ini oluşturmaktadır. Lipidler arasında trehalose monomycolatlar ve trehalose dimycolatlar gibi fagozomların göçünü engelleyen ve granülüm oluşumunu provoke eden açillenmiş trehalozlar bulunmaktadır(43,44).

3.3. Mikobakterilerde Üreme Özellikleri

M. tuberculosis, Uygun laboratuvar şartları altında her 12 ila 24 saatte bir bölünmektedir. Bu jenerasyon zamanı, dakikalarla ölçülen bölünme sürelerine sahip kültüre edilebilir çoğu diğer bakterilerle karşılaştırıldığında son derece yavaştır. Yavaş bölünme hızı, besin alımını sınırlayan hücre duvarı geçirimsizliği tarafından kısmen belirlenebilirse de, yapılan bazı çalışmalarda ribonükleik asit (RNA) sentezinin, tüberküloz basilinin uzun bölünme süresi ile ilişkili ana faktör olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda *mycobacterium tuberculosis*'teki RNA/DNA oranının ve RNA nükleotit zincirinin uzama hızının, *Escherichia coli*'ye oranla on kat daha yavaş olduğu ortaya konulmuştur(45). Mikobakterilerin üreme gereksinimleri çok fazla olduğu için, laboratuvar ortamında kültürlerinin yapılmasında katı ya da sıvı bazlı sentetik veya yarı sentetik zenginleştirilmiş besiyerleri kullanılmaktadır. Günümüzde bu amaçla MGIT 960, BACTEC-TB 460, MYCOLOR TK gibi sıvı besiyerleri veya Löwenstein-Jansen gibi katı besiyerleri kullanılmaktadır ya da her iki besiyerleri birlikte kullanılmaktadır. Mikobakteriler

aerob bakteriler olmalarına rağmen laboratuvar ortamındaki ilk izolasyonlarında %5-10 oranında CO₂'in bulunmasının bakteri gelişimini desteklediği belirlenmiştir. Basilin çoğalabildiği sıcaklık ve hidrojen iyonu konsantrasyon aralıkları nispeten dardır. Löwenstein-Jansen besiyerinde optimum üreme ısısı olan 37(28-42)⁰C de ve pH 7.0±0.2'de, ortalama 4-6 haftada ürerler. Sıvı bazlı besiyerlerinde bu süre daha kısa olup, MGIT 960 sıvı besiyerinde ortalama üreme süresi 7-14 güne kadar kısaltılabilmektedir(46,47).

3.4. *M. Tuberculosis* Genom Özellikleri

Mikobakteriyel genomların organizasyonunun kapsamlı olarak anlaşılması, 1998 yılında *M. tuberculosis*'in tam genom dizisinin aydınlatılmasıyla başlamıştır. Patojenik karakterdeki mikobakterilerin biyolojisini anlamak ve bu patojenlere karşı yeni profilaktik ve terapötik müdahale yöntemleri geliştirmek amacıyla 1998 yılında *M. tuberculosis*'in en iyi karakterize edilmiş suşu olan, H37Rv suşunun tam genom dizilimi belirlenmiştir. Genom analizi sonucunda kromozomunun halka şeklinde olduğu, 4.411.529 baz çifti içerdiği ve yaklaşık olarak 4.000 gen içerdiği belirlenmiştir. DNA'larında çok yüksek oranda G+C(% 62-70) içeriğine sahip olan bu bakteriler, mikolik asit üreten *Nocardia*(%60-69), *Rhodococcus* (%59-69) ve *Corynebacterium* spp.(%51-59) gibi diğer bakteri türleriyle benzerlik göstermelerine rağmen, genom kapasitesinin çok büyük bir bölümünün lipogenez ve lipoliz ile ilgili enzimlerin kodlanmasına ve antijenik varyasyon için bir kaynak oluşturan tekrarlayan bir yapıya sahip glisin bakımından zengin iki yeni protein ailesine ayrılmış olması bakımından diğer bakterilerden oldukça farklılık göstermektedirler(48,49).

3.5. Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Actinomycetales takımının *Mycobacteriaceae* familyasının içerisinde yer alan, *Mycobacterium* cinsi yaklaşık olarak 169 farklı tür barındırmaktadır. Bu türlerin çoğu doğada saprofit olarak bulunurken bir kısmı insan ve hayvanlar için klinik bir öneme sahiptir. Bu türler *M. tuberculosis* kompleksi (MTBK), *M. leprae* ve bunların dışında kalan Tüberküloz dışı (Nontuberculous mycobacteria=NTM) olmak üzere üç ana gruba ayrılır(50). TB'un etyolojik ajanı olan MTBK üyeleri tanımlanmış

herhangi bir çevresel rezervuarları olmayan, insan ve hayvanların hücre içi patojenleridirler.

Coğrafi dağılımları, belirli fizyolojik özellikleri (koloni morfolojisi, inhibitörlere duyarlılık profilleri v.b) ve Mikobakteri genomik analizleri dikkate alınarak, konak seçicilikleri ve patojeniteleri farklı olmasına rağmen, DNA benzerlikleri temel alınarak yakın ilişkili türlere “kompleks” adı verilmektedir. Bu tanımlaya göre, yüksek oranda nükleotid dizi benzerliği gösteren, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. mungi*, *M. orygis* ve *M. pinnipedii* gibi mikobakteriler, *M. tuberculosis* kompleks/MTBK adlandırılmaktadırlar(46,47,50). MTBK içerisinde yer almayan diğer mikobakteriler, Tüberküloz Dışı Mikobakteriler /TDM ve ya atipik mikobakteriler olarak sınıflandırılırlar.

3.5.1. Fenotipik özelliklerine göre sınıflandırma

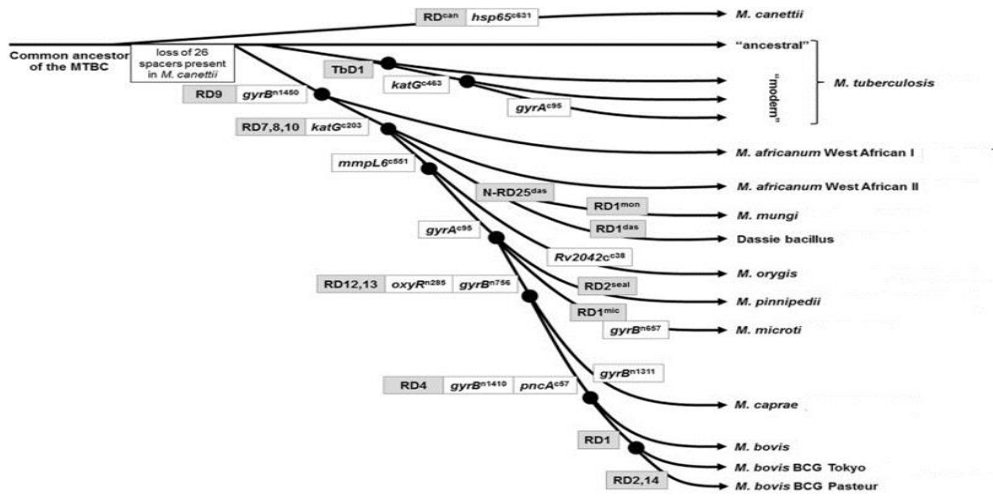
Mikobakteri genusuna ait türlerin sınıflandırılmasında koloni morfolojisi ve üreme hızları, pigment üretimi gibi bazı biyolojik özelliklerine göre sınıflandırma işlemleri Ernest Runyon tarafından 1950’de gerçekleştirilmiştir(51,52). Daha önce de belirtildiği gibi mikobakteriler ; MTBK, *M. leprae* ve bunların dışında kalan NTM olmak üzere üç ana gruba ayrılır. *M. tuberculosis* ve MTBK türleri yavaş ürerler, kolonileri ya pigmentsizdir ya da açık ten rengindedir (Resim:1). Evrimsel genom indirgemesi nedeniyle diğer tanımlanmış tüm mikobakteri türlerinden genetik ve fenotipik olarak farklı olan *M. leprae*’nın bu güne kadar in vitro kültürü yapılamamıştır. Atipik mikobakteriler olarak adlandırılan Üçüncü ana büyük grubu oluşturan mikobakteriler, üreme hızları ve pigmentasyon özelliklerine göre Runyon tarafından; yavaş üreyen fotokromojenler (örneğin, *M. kansasii*, *M. marinum*), yavaş üreyen skotokromojenler (örneğin, *M. gordonae*), yavaş üreyen pigmentsiz mikobakteriler (örn. *M. avium*, *M. intrasellüler*) ve hızla üreyen mikobakteriler (örn. *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*) olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Hızlı üreyen mikobakteriler bu güne tanımlanmış atipik mikobakterilerin yaklaşık %95’ini oluşturan çoğu saprofit veya insan ve hayvanlar için non-patojen mikobakterilerdir (Tablo). Günümüzde Mikobakterilerin hızlı tespiti ve tanımlanması için kullanılan yöntemler bu şemayı daha az önemli hale getirmiştir(53,54,55).

3.5.2. Genotipik özelliklerine göre sınıflandırma

Konak tropizmleri, fenotipleri ve patojeniteleri farklı bir grup, insan ve hayvan petojeni olan MTBK üyeleri, %99.9 oranında genom nükleotid dizilimi benzerliği göstermektedir(19,56). Hepsinin ortak bir atadan türediğini varsayarsak, bazılarının yalnızca insan (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*) veya kemirgen patojenleri (*M. microti*), diğerlerinin ise geniş bir konakçı spektrumuna (*M. bovis*) sahip olması şaşırtıcıdır.

Bu farklı konak adaptasyonları ve patojenitelerine rağmen, MTBK üyeleri %0,01-0,03 oranında sinonim nükleotit varyasyonları göstermektedir. Bununla birlikte analizler için hedeflenmiş bu genomik varyasyon bölgelerinin varlığı veya yokluğu, SNP veri kümelerinin karşılaştırılması yoluyla klonal farklılık gösteren bazı belli başlı filogenetik kökenler ayırt edilebilmektedir.

Yapılan karşılaştırılmalı genomik analizler sonucunda MTBK üyeleri arasında delesyona bağlı olarak genetik materyal kaybını temsil eden ve genom büyüklüğü 2-12.7 kb arasında değişen 16 farklılaşma bölgesi (Regions of Difference=RD1-16) tespit edilmiştir. Bu grupta rekombinasyon henüz tespit edilmediğinden, kayıp bir DNA dizisi tekrar kazanılmayacağı ve bu durumun klonal farklılıklara yol açacağı düşünülmektedir. Farklılaşma bölgeleri(RD) ve seçilen bazı genlerdeki sekans polimorfizmleri kriter alınarak yapılan bir çalışmada, MTBK üyelerinin filogenetik evrimsel şeması(Şekil 1) ortaya konulmuştur(19,57).



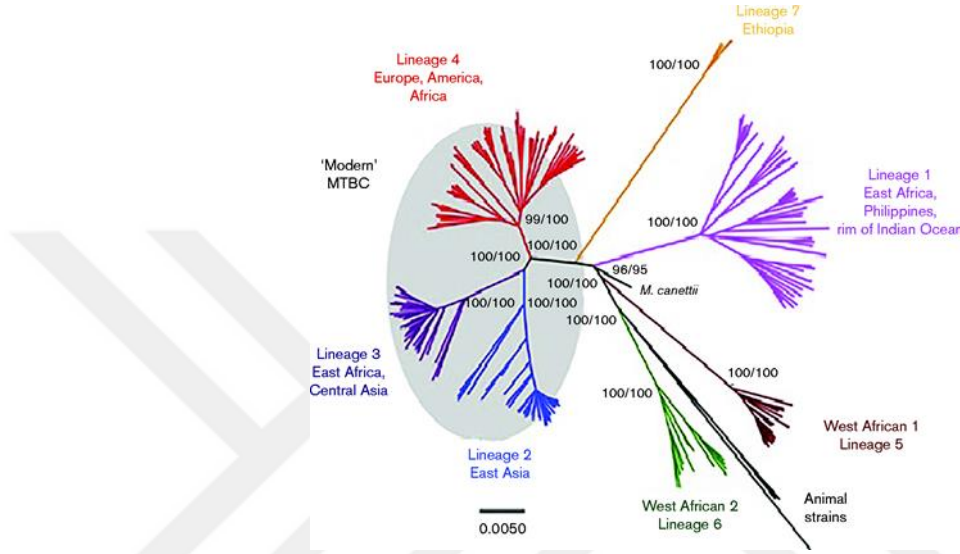
Şekil 1. Belirli soylarda ardışık DNA kaybını gösteren tüberküloz basilinin önerilen evrimsel şeması(57)

RD polimorfizmleri kriter alınarak yapılan karşılaştırılmalı genomik çalışmalara göre; MTBK üyelerinden *M.tuberculosis* ve *M.canettii*'nin RD9 farklılaşma bölgesini korumuş olmalarıyla diğer MTBK üyelerinden filogenetik olarak ayrılırlar. *M.tuberculosis* RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13 ve RD14 farklılaşma bölgelerini korumuştur. Bu RD profili *M.tuberculosis*'i diğer MTBK üyelerinden filogenetik ve evrim sırası yönünden ayırmaktadır. *M.tuberculosis* RD9 bölgesine ek olarak RD4-RD11 farklılaşma bölgelerini korumuş olmasıyla *M.bovis*'ten, *M.bovis* RD1, RD2, RD4 gen bölgelerini kaybetmiş olmasıyla *M. bovis* BCG'den filogenetik olarak farklılaştırmaktadır. (Brosch et al. 2002). *M. bovis*, RD1, RD2, RD4, RD12, RD13, ve RD14 gen bölgelerinin delesyona uğramış olmasıyla *M. microti* 'den ayrılmıştır(58).

Tipik olarak *M .africanum* coğrafi kökene ve biyokimyasal özelliklere göre iki ana alt gruba ayrılmaktadır. *M. africanum* alt türlerini içeren bu alt gruplar; Batı Afrika kökenli ve *M. bovis* benzeri özellikler sergileyen subtip I, Doğu Afrika kökenli ve *M. tuberculosis* benzeri özellikler gösteren subtip II'dir. *M.africanum* RD9 bölgesinin delesyonuyla *M.tuberculosis* ve *M.canettii*'den, RD7, RD8 ve RD10 farklılaşma bölgelerinin delesyonuyla birbirlerinden ayrılmışlardır (19,58).

Diğer bakterilerle karşılaştırıldıklarında, MTBK üyeleri arasında %0,01-0,03 oranında sinonim nükleotit varyasyonları göstermeleriyle genetik homojenliğin en uç örneklerinden birini oluştururlar. Bu durum MTBK üyelerinin farklı konak adaptasyonları, coğrafi dağılımları ve patojenitelerine rağmen ortak bir atadan köken aldıklarını düşündürmektedir. MTBK üyelerinden insanlara adapte olmuş, *M. tuberculosis sensu strictu* olarak adlandırılan ve bazıları küresel bir yayılım gösterirken bazıları da ancak belirli bölgelerle sınırlı olan yedi soy tanımlanmıştır (59,60). Bu soylar MBTK üyelerinin 20 farklı genomik bölgesinin insersiyon/delesyon analizine dayanarak belirlenmiştir. Bunlardan soy1; Doğu Afrika, Filipinler, Hint Okyanusu bölgesinde, soy 2 Beijing suşu da dahil Doğu Asya'da, soy 3 ; Doğu Afrika, Orta Asya'da, soy 4 : Avrupa, Amerika, Afrika'da, *M. africanum* filogenetik olarak farklı iki soya bölünmüş olarak, soy 5 ; Batı Afrika 1 ve soy 6 ; Batı Afrika 2 ve soy 7: Etiyopya'da olmak üzere coğrafi bölgelere

dağılmışlardır (Şekil 2). Genomik delesyonların filogenetik analizlerine dayanarak MTBK'ye özgü bir TbD1 (specific deletion 1) bölgesinin varlığı veya yokluğuna dayanarak bu soylar modern(TbD1-) ve ya antik(TbD1+) soylar olarak iki alt gruba ayrılabilir. Buna göre Beijing, African ve Haarlem suşlarını içeren 2,3 ve 4 soyları modern soylar iken, 1, 5, 6 ve 7 soyları ile *M. bovis*, *M. microti* ve *M. pinnipedi* gibi konak adaptasyonları hayvanlar olan soylar antik soylar olarak gruplandırılmıştır(18).



Şekil 2. MTBK üyelerinin genom çalışmalarına dayalı filogenetik soyları(18)

3.6. Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz Epidemiyolojisi

M. tuberculosis'in tüm genom analizlerinin gerçekleştirilmesinden bu yana giderek artan oranda elde edilen bilgi birikimi, basilin yeryüzünde ilk ortaya çıkışından, tarih boyunca yaptığı salgınlara kadar, insanlık tarihindeki izlerini sürmemize olanak sağlamıştır. Milyonlarca yıl önce doğada ortaya çıkmış olan çevresel mikobakterilerden, yatay transfer mutasyonu yoluyla evrimleşmiş olan mikobakteriyel türlerin, ilk olarak orta Afrika’da insanlara adapte olmuş ve daha sonra Ortadoğu’ya ve Uzakdoğu’ya yayıldığı tahmin edilmektedir. Tüberküloz’un ilk büyük epidemilerinin, dünyanın en eski yerleşik medeniyetlerinin bulunduğu Mezopotamya bölgesindeki yerleşik hayatla birlikte ortaya çıktığı ve ardından Doğu Asya, Akdeniz bölgesi, Rusya ve Kuzey Avrupa dâhil olmak üzere diğer bölgelere yayıldığı varsayılmaktadır (24).

Tüberküloz basilinin Robert Koch tarafından keşfedilmesinden bir yüzyıldan fazla bir süre geçmiş olmasına rağmen, tüberküloz tek bir bulaşıcı ajandan

kaynaklanan küresel ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık Dörtte birinin *M. tuberculosis* kompleks üyeleri ile latent olarak enfekte olduğu ve bu enfekte kişilerin yaklaşık olarak %10'unun yaşamlarının bir noktasında aktif enfeksiyon gelişeceği düşünülmektedir (61).

Tüberküloz tanı ve tedavisindeki gelişmeler 20. yy ortalarında gelişmiş ülkelerde enfeksiyonun görülme sıklığında ve mortalite oranlarında önemli bir azalma sağlamış olsa da yüzyılın sonlarında artan AIDS vakaları ve çoklu ilaca dirençli *M. tuberculosis* suşlarının ortaya çıkması, tüberkülozun tekrar gündeme gelmesine neden olmuştur(62).

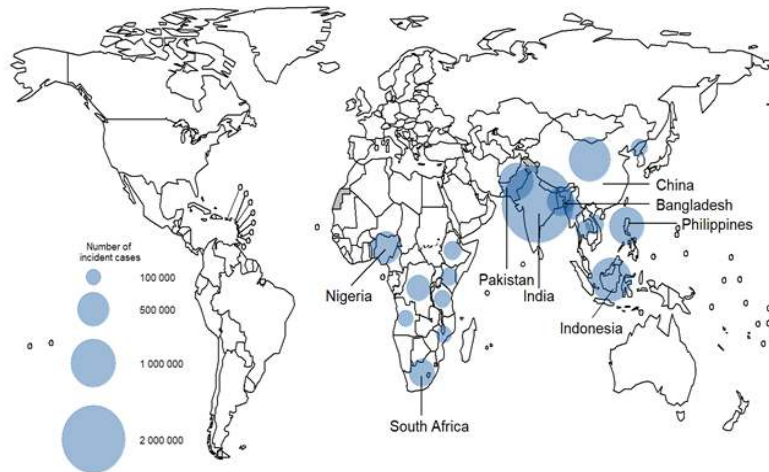
Afrika'daki HIV epidemisinin TB vakaları ve ölümlerinin sayısı üzerindeki dramatik etkisi DSÖ'nün 1993'te TB için küresel düzeyde acil durum ilan etmesine ve TB nin bakımı ve kontrolü için bütün ülkelere Doğrudan Gözetimli Tedavi (DGTS) stratejisi uygulamalarını ve böylelikle tüberkülozun eradikasyonunu gerçekleştirmeleri için harekete geçmelerini önermiştir. Bu stratejiyle TB insidansında ve neden olduğu ölüm oranlarında önemli oranda azalma sağlanmış olursa da HIV ile enfekte kişilerin sayısında meydana gelen artış ve ÇİD-TB ile YİD-TB suşlarının ortaya çıkması ve yayılmasıyla ilgili artan küresel endişeler, Dünya Sağlık Örgütü'nü TB'yi küresel ölçekte daha etkin bir şekilde ele alma ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. MTBK türleri arasında artan oranda gelişen ilaç direnci, yoksulluk, düzensiz göçler, yetersiz beslenme ve gelir adaletsizliğindeki dağılım özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde DSÖ tarafından önerilen eradikasyon programlarının yetersiz uygulanmasına neden olmuştur. Bu durum DSÖ'nün iki bin yılı için belirlemiş olduğu hedefin tam olarak gerçekleşmesini engellemiştir. Bunun üzerine DSÖ 2015 yılında 1990 verileri baz alınarak, TB'nin küresel yükünü azaltmak ve tüberküloza bağlı ölümleri yüzde elli oranında azaltmak için Tüberkülozu Durdurma Stratejisi (The Stop TB Strategy) programını uygulamıştır. Ardından 2050 yılında tüberkülozu büyük oranda eradike etmeyi hedefleyen ve 2015 ile 2035 yılları arasında uygulanacak olan END TB stratejini uygulamaya başlamıştır(3,63,64,65).

DSÖ, 1997'den beri her yıl küresel bir TB raporu yayınlamaktadır. Bu raporun amacı, TB salgınının durumunu ve küresel stratejiler ve hedefler bağlamında bu

epidemiye karşı verilen mücadelenin etkinliğini bölgesel ve ulusal düzeylerde kapsamlı ve güncel bir değerlendirmesini yapmaktır. Bu raporlar başlıca, DSÖ'nün üye ülkelerden toplamış olduğu verilere dayanmaktadır. DSÖ'nün 2021 TB raporu dünya nüfusunun yaklaşık olarak %99'unu kapsayan 197 ülke ve bölgeden elde edilen verilerin analiz edilmesiyle hazırlanmıştır(3).

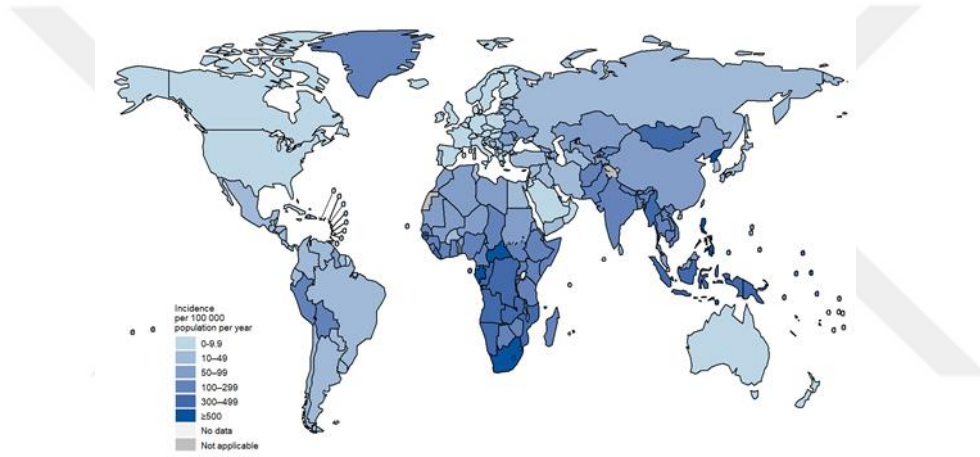
Günümüzde halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit olmaya devam eden tüberküloz, 2020'de dünya üzerindeki en yaygın ölüm nedenleri arasında on üçüncü, tek bir enfeksiyon ajanından kaynaklanan ölümü nedenleri arasında 2.ci sırada yer almaktadır. DSÖ tarafından 2021 yılında yayınlanan küresel tüberküloz raporuna göre; 2020 yılında Dünya çapında tahminen 9,9 milyon (8,9–11 milyon) yeni tüberküloz vakasının meydana geldiğini(127/100 000) ve TB enfeksiyonu nedeniyle 1,3 milyonu(1,2-1,4 milyon) HIV negatif kişiler arasında, 214 000(187 000-242 000)'i HIV pozitif kişiler arasında olmak üzere toplamda 1,5 milyondan fazla kişinin ölümüne neden olduğu tahmin edilmektedir(3).

DSÖ'nün 2021 raporuna göre Coğrafi olarak, 2020 de tahmini olarak TB olgularının çoğu, Güneydoğu Asya (%43), Afrika (%25) ve Batı Pasifik (%18) bölgeleri ile daha az bir kısmı Doğu Akdeniz (%8.3), Amerika (%3.0) ve Avrupa (%2.3) bölgelerindeydi. Ülkeler bazında düşünüldüğünde, Yüksek TB yüküne sahip olan 30 ülke, dünya çapında tüm tahmini TB vakalarının %86'sını oluşturuyordu. Bu ülkelerden, Hindistan (%26), Çin (%8.5), Endonezya (%8,4), Filipinler (%6,0), Pakistan (%5,8), Nijerya (%4,6), Bangladeş (%3,6) ve Güney Afrika (%3,3) olmak üzere sekizi, TB vakalarının küresel toplamın üçte ikisini oluşturuyordu (3).



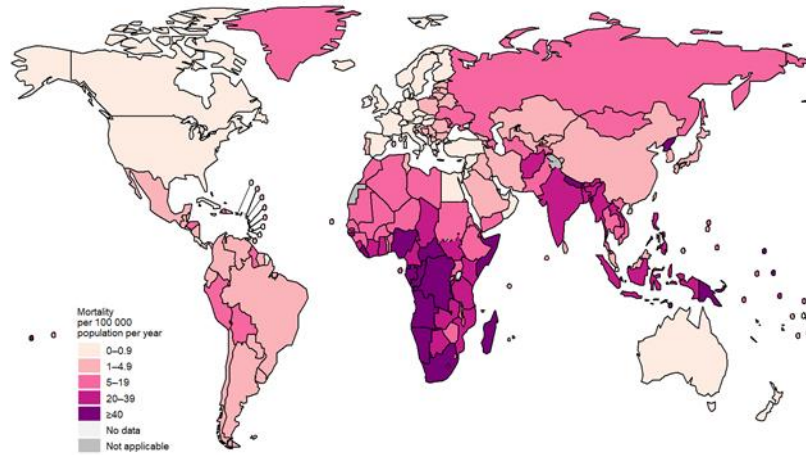
Şekil 3. Vaka sayısı açısından ilk sekiz sırada yer alan ve 2020'deki küresel vakaların üçte ikisini oluşturan sekiz ülke(3)

Ulusal TB salgınlarının insidansı, yılda 100.000 nüfus başına düşen TB vakası sayısı ile belirlenmekte olup bu oran ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir(şekil 4). 2020'de TB insidansı çoğu Amerika, Avrupa, Doğu Akdeniz ve Batı Pasifik Ülkelerinde olmak üzere 57 ülkede TB insidansı yıllık 100.000 kişide 10'dan az vaka görülürken, Yüksek TB yükü olan 30 ülkenin çoğunda 100.000 kişide 150-400 TB vakası bildirilmiştir. Orta Afrika Cumhuriyeti, Kore Demokratik Halk Cumhuriyeti, Gabon, Lesoto, Filipinler ve Güney Afrika'da TB insidansı 100.000 nüfus başına 500'den fazla TB vakası bildirilmiştir.(3)



Şekil 4. 2020 yılı Tahmini TB insidans oranları(3)

Yaş ve cinsiyetten bağımsız olarak tüm bireyleri etkileme potansiyeline sahip olan tüberküloz, kadınlarla karşılaştırıldığında erkeklerde biraz daha fazla görülmektedir. 2020 de görülen vakaların %56 sını yetişkin erkekler, %33 ünü yetişkin kadınlar ve %11 inin çocuklardan oluştuğu rapor edilmiştir. 2020'de küresel olarak, HIV-negatif insanlar arasındaki TB ölümlerinin yaklaşık %84'ü ve HIV-negatif ve HIV-pozitif insanlar arasındaki toplam TB ölümlerinin %85'i DSÖ Afrika ve Güneydoğu Asya bölgelerinde meydana geldiği rapor edilmiştir. HIV negatif kişiler arasındaki ölümlerin %53'ü erkek, %32'si kadın ve %16'sı çocuklardır (<15 yaş). HIV pozitif kişilerde tüberküloz ölümlerinin %50'si erkek, %40'ı kadın ve %9,8'inin çocuk olduğu bildirilmiştir(3).



Şekil 5. HIV negatif kişilerde 2020 yılı tahmini TB ölüm oranları⁽³⁾

Antimikrobiyallere direnç doğal bir fenomendir, bununla birlikte *M. tuberculosis*'teki anti-TB ilaçlara direnç, genellikle yetersiz veya eksik tedavi sırasında spontan ilaç direnci mutasyonlarının yapay seçiminden kaynaklandığı için “insan yapımı” olarak kabul edilir. Yaklaşık olarak bundan otuz beş yıl önce Michael Iseman, etkili olmayan TBC kontrol programlarının ‘bilinçsiz genetik mühendisliğine’ işaret etti ve patlamayı bekleyen zaman ayarlı bir bomba konusunda uyarıda bulundu. Birinci basamak ilaçlara karşı direnci önlemekte veya kontrol altına almamakta, "Son derece tedavi edilebilir bir enfeksiyonu farkında olmadan tedavisi aşırı derecede pahalı olan, yaşamı tehdit eden bir hastalığa dönüştürüyoruz" diye yazdı(66,67).

İlaça dirençli tüberküloza yanıt vermek, muhtemelen küresel sağlığın karşı karşıya olduğu en derin zorluklardan biridir. Anti-TB ilaçlara direnç gelişimi, 1947'de (streptomisin) piyasaya sürüldükten kısa bir süre sonra tespit edildi. Geçtiğimiz 40 yıl içinde, giderek artan oranda TB suşlarında klinik, epidemiyolojik ve laboratuvar verilerine dayanan çeşitli ilaç direnci modelleri ortaya çıkmıştır. İlaç direncinin belirlenmesi, TB'nin bakteriyolojik olarak doğrulanmasını, hızlı moleküler testler ve dizileme teknolojilerinin kullanımı ile ilaç direncinin test edilmesini gerektirmektedir(68,69).

Günümüzde DSÖ, ilaca dirençli TB vakalarını beş kategori sınıflandırmaktadır. Bunlar; izoniazide dirençli TB, RR-TB, ÇİD-TB, pre-extensively drug-resistant TB (pre-XDR-TB) ve YİD-TBdir. Tüberküloz tedavisinde kullanılan primer anti-

tüberküloz ilaçlardan en etkili iki birinci basamak ilaç olan izoniazid ve rifampisine karşı direncin birlikte görülmesi ÇİD-TB olarak tanımlanır. Bu iki antitüberküloz ilaca direnç en etkili iki primer antitüberküloz ajanı olduklarından klinik öneme sahiptirler. Pre-XDR-TB, rifampisine ve herhangi bir florokinolon'a dirençli TB'dir. YİD-TB, rifampisin ile birlikte herhangi bir florokinolon ve ayrıca bedakuilin ve linezolid ilaçlarından en az birine dirençli TB'dir.(3)

Küresel olarak, son on yıldır tespit edilmiş olan yeni tüberküloz vakalarının içerisindeki ÇİD-TB veya RR-TB'nin (ÇİD/RR-TB) vakalarının oranı %3-4, daha önce tedavi edilmiş kişiler arasında %18-21 düzeyindedir. Bu oran 2020 yılı için tahminen 350-400 bin civarında kişi olup çoğunluğu pulmoner TB vakalarından oluşmaktadır(WHO2018-19-2020-2021). 2020'de dünya çapında akciğer tüberkülozu teşhisi konan 4,8 milyon kişiden %59'unun bakteriyolojik olarak doğrulandığı tespit edildi. Bakteriyolojik olarak doğrulanmış bu vakaların %71'i (2,1/3,0 milyon) rifampisin direnci için test edilmiş olup, bunlar arasında toplamda 157 903 TB vakası ilaca dirençli olarak tespit edilmiştir. Bunların 132 222 MDR/RR-TB vakası ve 25 681 XDR-TB öncesi veya XDR-TB vakası tespit edildi. 2019'da tespit edilmiş olan 201 997 dirençli TB vakası ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak %22'lik bir düşüş olduğu gözlemlenmektedir. 2019 da 177100, 2020'de dünya çapında 150 359 yeni ÇİD/RD-TB hastası tedavi almaya başlamıştır. (WHO2021) 2018'den 2020'ye kadar tedavi edildiği bilinen kayıtlı ÇİD/RD-TB'li kümülatif toplam hasta sayısı 482 683'tür ve bu rakam, DSÖ'nün (2018-2021) yılları arası için belirlemiş olduğu 1,5 milyonluk hedefin yalnızca %32'sine denk gelmektedir. Ayrıca Çin, Demokratik Kongo Cumhuriyeti, Hindistan, Endonezya, Nijerya, Pakistan, Filipinler, Rusya Federasyonu, Güney Afrika ve Vietnam tahminen küresel ÇİD/RD-TB yükünün yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır(6,7,3)

Günümüzde giderek artan oranda anti- tüberküloz ilaçlara dirençli suşların ortaya çıkması hem halk sağlığını hem de tüberküloza karşı verilen mücadelede uygulanan programların başarısını ciddi oranda tehdit etmektedir. DSÖ'nün başlatmış olduğu Tüberküloz Sonu Stratejisi, 2015'e kıyasla 2020'e kadar tüberküloz insidansını %20 azaltmayı ve tüberkülozdan ölüm oranını % 35 azaltmayı, 2035'te ise TB insidansını %90 azaltmayı ve ölüm oranını ise %95 azaltmayı hedeflemiştir. Küresel olarak, TB insidans oranındaki ortalama düşüş oranı 2000-2018 döneminde

yıllık ortalama % 1,6 ve 2017 ile 2018 arasında % 2,0 olduğu kaydedilmiştir. 2015 ile 2018 arasındaki kümülatif azalma yalnızca% 6,3't . Bu oranlar Tüberkülozu sonlandırma stratejisinin 2015-2020 yılı periyodu için hedeflenmiş olan % 20'lik bir azalmanın çok gerisinde bir orandır. 2015 ile 2020 yılları arasında Tüberküloz kaynaklı ölüm sayısındaki küresel düşüş oranı % 9,2 olup, bu oran DSÖ' nün 2020 yılı için belirlemiş olduğu tüberkülozu sonlandırma stratejisinin hedeflemiş olduğu % 35'lik düşüş oranının yaklaşık olarak dörtte birine denk gelmektedir. Bu oran DSÖ'nün 2020 yılı için belirlemiş olduğu Tüberkülozu sonlandırma stratejisinin kilometre taşları olan rakamlara ulaşmak için yeteri düzeyde olmadığımızı göstermiştir(2,3,6,70).

Ülkemizde tüberküloza karşı verilen mücadelenin tarihi bir yüzyıldan daha fazla bir geçmişe sahip olmasına rağmen, tüberkülozun kontrolü ve eradikasyonu için verilen sistematik çabalar, DSÖ tarafından 2007 benimsenmiş olan tüberkülozu durdurma stratejisine paralel ve aynı standartlara sahip “Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı” nı uygulamasıyla başlamıştır. Bu amacın gerçekleştirilmesi için gerekli olan, planlama, alt yapı, bütçe ve insan kaynakları Sağlık bakanlığı tarafından karşılanmaktadır. Bu program kapsamında herhangi bir sosyal güvenceye bakılmaksızın tüberkülozlu ve ya temaslı tüm vatandaşlarımıza, sağlık kuruluşlarından ilaç temin edilip dağıtılmaktadır. Ayrıca Dispanser ve sağlık kuruluşlarına kayıtlı tanı konulan her bir tüberkülozlu hastanın verileri toplanarak analiz edilip raporlanmaktadır. Elde edilen veriler ulusal tüberküloz raporları haline getirilerek yayınlanmaktadır. Aynı zamanda bu veriler “Dünya Sağlık  rg t  Tüberküloz Ağı” na girilerek, Küresel Tüberküloz Raporlarının hazırlanmasına katkıda bulunulmaktadır.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bir halk sağlığı sorunu olmaya devam eden T berk lozla ilgili Türkiye halk sağlığı kurumunun 2020 yılında yayınlamış olduğu “Türkiye’de Verem Savaşı 2019 Raporu” verilere göre; ülkemizde 2017 yılında 12.046 tüberküloz hastası sağlık kuruluşları kayıtlarına girmiş ve bu olguların 68’inin HIV (+) olduğu tespit edilmiştir. Toplam olgu hızı yüz binde 14,9 olarak belirlenmiştir. DSÖ verilerine göre 2016 yılında ülkemizde görülen TB vakalarının 211’i çoklu ilaca dirençli, 9 u yaygın ilaca dirençli iken, 2017 yılında görülen

vakalardan 191'i çoklu ilaca dirençli, ikisi ise yaygın ilaca dirençli olduğu tespit edilmiştir.(2,71)

Dünya Sağlık Örgütünün 2019 da yayınlamış olduğu küresel tüberküloz raporunda; Ülkemizdeki TB insidansı yüz binde 16 ve tahmini mortalite hızı da yüz binde 0,51 olarak verilmiştir. Aynı raporda; Türkiye'den 2018 yılında bildirilen Yeni + nüks vaka sayısı 11786 olup bu vakalarının %40'nın kadın, % 54'ünün erkek, %6'sın çocuk(0-14 yaş) olduğu bildirilmiştir. İlgili raporda bildirilen vakaların %65'nin pulmoner tüberkülozlu, %35'inin akciğer dışı tüberküloz vakaları olduğu belirlenmiştir.(²)

Tüberküloz tedavisinde karşılaşılan ve kontrol programları için ciddi bir tehdit etyolojik ajanın ilaç direnci geliştirmesidir. DSÖ verilerine göre 2020 yılında ülkemizde tedavi yeni edilen vakaların % 3,5(3-4) inde ve önceden tedavi almış vakaların % 12(9-15) sinde ilaç direnci geliştiği bildirilmiştir(2).

3.7. Antitüberküloz İlaçların Etki ve Direnç Mekanizmaları

3.7.1. Primer antitüberküloz ilaçlar

3.7.1.1. Streptomisin

Bir aminosiklitol glikozit olan streptomisin, *Streptomyces griseus*'tan izole edilen ve TB'ye karşı başarıyla kullanılan ilk antibiyotik olup, DSÖ tarafından önerilen alternatif birinci seçenek bir anti-TB ilacıdır. Bu nedenle STR, INH, RIF, PZA ve EMB'yi içeren dört ilaç rejimiyle birlikte TB vakalarının yeniden tedavisinde kullanılmaktadır(72). Streptomisin 16S rRNA ve S12 ribozomal proteini (rrs ve rpsL) ile etkileşime girerek mRNA'nın yanlış okunmasına ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olur(73).

STR, TB'ye karşı başarıyla kullanılan ilk antibiyotikt olmasına rağmen, terapide tek başına kullanımının bir sonucu olarak kısa bir süre sonra ilaca karşı direncin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Yapılan çalışmalarda STR ye dirençli izolatlarda 16S rRNA'yı kodlayan rrs geninde ve Ribozomal S12 proteinini kodlayan rpsL geninde iki tür mutasyonun meydana geldiği tespit edilmiştir(74). Sonuç olarak, rpsL ve rrs genlerindeki mutasyonlar, streptomisine direncin ana mekanizmalarıdır, ancak STR dirençli izolatların %65-67'sinde rrs ve rpsL genlerinde nokta

mutasyonları bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda rpsL'de Lys43Arg amino asit değişimin en yaygın mutasyon olduğu ve bunun da yüksek STR direncine neden olduğu saptanmıştır. STR direncinden sorumlu olan diğer mutasyonların rrs'de 530. ve 915. kodonlardaki mutasyonlar oldukları saptanmıştır. Son yıllarda, 16S rRNA'ya özgü korunmuş bir 7-metilguanozin metiltransferazı kodlayan bir gen olan gidB'deki mutasyonların, streptomisine düşük seviyeli direnç kazandırdığı da bildirilmiştir. Yine de bu iki gende mutasyon saptanmayan dirençli izolatların varlığı, STR direncinden sorumlu başka mekanizmaların da var olduğunu düşündürmektedir(73,75).

3.7.1.2. İzoniazid (INH)

İzoniazid (INH) olarak da bilinen izonikotinik asit hidrazid, 1952'den beri tüberkülozun efektif tedavisinde ve profilaksisinde kullanılan bir antibiyotik olup, günümüzde hala kullanılan primer antitüberküloz ilaçlardan biri olmaya devam etmektedir. (76). INH, mikolik asitlerin biyosentezini inhibe ederek mikobakteriyel hücre duvarına karşı etkisini göstermekte ve böylelikle hücre lizisine neden olmaktadır. Bu inhibisyon, yağ asidi sentaz II sisteminin NADH bağımlı enoil-acyl carrier protein (ACP) reduktaz enzimi ile etkileşime girmesi yoluyla mikolik asitlerin sentezini inhibe ederek etki eder. INH'ın etkisini göstermesi için katG geni tarafından kodlanan katalaz/peroksidaz enzimi tarafından aktive edilmesi gerekir. KatG aktivasyonu, NADH ile reaksiyona girerek InhA genin kodladığı enziminin aktif bölgesine bağlanan bir NAD-INH eklentisi oluşturur. (77,78)

Ne yazık ki, izoniazidin kullanımından kısa bir süre sonra klinik izolatlarda INH'ye karşı direnç geliştiği bildirilmiştir. (Steenken ve ark. 1952). INH direnci, inhA genin aktif bölgesi, inhA promotor bölgesi ve katG içindeki mutasyonlar dâhil olmak üzere çeşitli yollarla ortaya çıkar (79). Bununla birlikte klinik izolatların yaklaşık %22'sinde bilinen bir direnç mekanizması tespit edilememiştir. inhA geni içinde meydana gelen bazı mutasyonlar, NAD-INH için hedef protein olan enoil acyl carrier protein (ACP) reduktaz enziminin aktif bölgesinde yapısal değişiklikler meydana getirmesi yoluyla, NAD-INH 'nın ilgili enzime bağlanma afinitesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. (80). INH aktif bioformuna dönüştürmek için gerekli olan katalaz-peroksidaz enzimini kodlayan katG geninde meydana gelen delesyonlar,

missense mutasyonlar ve insersiyonların enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu ve bunun da izolatlarda izoniazid direncine sebep olduğu düşünülmektedir. (81)

KatG geninde, özellikle izoniazide dirençli izolatlarda önemli genetik polimorfizmler vardır. izoniazide dirençli izolat arasında en yaygın mutasyonların Arg463Leu (%51), Ser315Thr (%29) ve Ser315Asn (%9.8) idi. Enzim kinetiği çalışmaları KatG genindeki Ser315Thr (S315T) mutasyonun enzim kinetiğini önemli oranda değiştirdiğini bunun da yüksek izoniazid direncine neden olduğu saptanmıştır. Yapılan farklı çalışmalarda İzoniazide direnç, katG ve inhA genlerindeki mutasyonlar dışında kasA, ahpC, ve oxyR gibi farklı genlerdeki mutasyonlarla da ilişkilendirilmiştir. (82,83,84)

3.7.1.3. Rifampisin

Rifampisin, 1972'de bir antitüberküloz ajanı olarak tanıtılan bir rifamisin türevidir. En etkili anti-TB antibiyotiklerden biridir ve izoniazid ile birlikte TB için çoklu ilaç tedavisi rejiminin temelini oluşturur. Rifampisin, büyüyen ve büyümeyen (yavaş metabolize olan) basillere karşı aktiftir(85). *M. tuberculosis*'te rifampisinin etki şekli, RNA polimerazın β -alt birimine bağlanarak mRNA'nın uzamasını inhibe etmesidir(86). *M. tuberculosis*'in rifampisine dirençli klinik izolatlarının çoğu, RNA polimerazın β -alt birimini kodlayan rpoB geninde mutasyonlar barındırır. Bunun sonucunda ilaca afiniteyi azaltan ve direnç gelişimine neden olan konformasyonel değişiklikler meydana gelir(87).

Rifampisine dirençli *M. tuberculosis* izolatlarının yaklaşık %96'sında, rpoB geninin 81-bp'lik 507-533 kodonlarında mutasyonlar saptanmıştır. Bu bölge aynı zamanda rifampisin direncini belirleyen bölge “rifampin resistance determining region (RRDR)” ve ya “hot spot” bölge olarak da bilinir(88). Yapılan çalışmaların çoğunda rpoB genindeki 516. , 526. Ve 531. Kodonlarındaki mutasyonların rifampisin direnci ile ilişkili en yaygın mutasyonlar olduğu bildirilmiştir(89,90). Daha az sıklıkta olmakla birlikte, bazı çalışmalarda, rpoB'nin “rifampin resistance determining region (RRDR)” dışında mutasyonların meydana geldiğini de bildirmişlerdir(91,92). rpoB geninde meydana gelen mutasyonlar diğer rifamisinlere çapraz direnç oluşturabildiği belirlenmiştir. Bazı kodonlardaki mutasyonlar (örn. 518 veya 529), rifampisine düşük seviyeli direnç ile ilişkilendirilmiştir, ancak yine de bu

durum rifabutin veya rifalazil gibi diğer rifamisinler için şüphelidir(93,94). Ancak Rifabutin, sitokrom P450 CYP3A oksidatif enziminin daha az etkili bir indükleyicisi olduğundan, bu durum antiretroviral tedavi alması gereken TB hastaları için önemli bir avantajdır(95). Öte yandan, rifampisine mono direnç oldukça nadirdir ve hemen hemen rifampisine dirençli suşlar özellikle izoniazide olduğu gibi diğer ilaçlara dirençlidirler. Rifampisin direncin ÇİD-TB için bir gösterge olarak düşünülmesinin temel nedeni budur(96).

Son zamanlarda yapılan genom dizileme çalışmaları, rpoB'deki mutasyonlara sahip rifampisine dirençli suşlarda RNA polimerazın α ve β' alt birimlerini kodlayan rpoA ve rpoC'de, telafi edici (compensatory) mutasyonların edinildiğini ortaya çıkarmıştır(97). Bu telafi edici(compensatory) mutasyonlar, dirençli suşların in vivo ortamda rifampisine duyarlılığın geri kazanılmasından sorumlu oldukları düşünülmektedir(98,99,73).

3.7.1.4. Ethambutol

TB tedavisinde izoniazid ile birlikte kullanılan etkili ve çok spesifik sentetik bir antibiyotik olan etambutol ilk kez 1996'da TB tedavisinde kullanılmaya başlanmış olup, günümüzde TB tedavi rejiminin birinci seçenek antibiyotikleri arasında yer almaktadır. Etambutol, arabinozil transferaz enzimiyle etkileşip hücre duvarındaki arabinogalakattan biyosentezini etkileyerek hücre duvarı sentezini bozarak, vegetatif formadaki basillere karşı bakteriyostatik etki göstermektedir. *M. tuberculosis*'te, bir operon olarak organize olmuş embCAB genleri, arabinogalakattan sentezinde yer alan arabinosil transferazı kodlayarak D-arabinofuranosil-P-dekaprenol birikimini sağlar. Arabinozun bir analogu olduğu düşünülen etambutol'un, arabinozil transferaz enzimini inhibe ederek, arabinogalakattan ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engellediği tespit edilmiştir(100,101)

Yapılan çalışmaların çoğunda, embB geninin 306. Kodonundaki mutasyonların etambutol direnciyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte yapılan bazı çalışmalar, etambutole duyarlı izolatlarda da embB 306. kodonunda mutasyonlar olduğunu tespit etmişlerdir. Çok sayıda *M. tuberculosis* izolatı ile yapılan bir çalışmada, embB306 kodonunda meydana gelen mutasyonun etambutol direnci için zorunlu olmadığı, ancak artan oranda direnç gelişimi için bir predispozan faktör

olduğunu ortaya koymuştur. Aslında, alelik değişim çalışmaları, belirli amino asit substitusyonuna (Met306Val, Phe330Val, Thr63Ile) neden olan bireysel mutasyonların yüksek etambutol direncine ($MİK \geq 40\mu g/ml$) neden olduğunu, diğer amino asit substitusyonlarının ise etambutol direnci üzerinde çok az veya hiç etkisi olmadığını göstermiştir. embB306'daki mutasyonların, etambutol direnci için gerekli olduğunu, ancak etambutole yüksek düzeyde direnç oluşturmak için yeterli olmadığını anlaşılmaktadır(73,75).

3.7.1.5. Pirazinamid

Pirazinamid, 1950'lerin başında TB tedavisinde kullanılmaya başlanılmış olup, günümüzde tüberküloz tedavi rejiminin birin seçenek antibiyotikler arasındaki yerini korumaktadır. Pirazinamid, nikotinamidin bir analogudur ve etkili sterilizasyon aktivitesine sahip olup, kemoterapötik rejimi 12 aydan 6 aya kadar kısaltır. Tüberküloz lezyonlarında, asidik bir ortamda bulunan semi-dorman basillerin üremesini inhibe etme özelliğine sahip ve pncA geni tarafından kodlanan pirazinamidaz/nikotinamidaz enzimi tarafından aktif formu olan pirazinoik aside dönüştürülmesi gereken bir ön-ilaçtır. Pirazinamidin etki mekanizması, pirazinoik asid'in bakteriyel membran enerjisini bozarak ve membran trasnportunu engelleyerek etkisini gösterir. Pirazinamid bakteri hücrelerine pasif difüzyonla girer ve pirazinoik aside dönüştürüldükten sonra zayıf bir akış pompası ile atılır. Asit koşulları altında, protonlanmış pirazinoik asit, verimsiz bir akış pompası nedeniyle hücreye geri emilir ve hücre içinde birikerek hücre hasara neden olur (102,73).

Pirazinamid direnci gösteren izolatlarda, ilacı aktif formuna dönüştüren pirazinamidaz enzimini kodlayan PncA geninde oldukça yaygın mutasyonlara rastlanılmıştır. M. tuberculosis pncA geninin Scorpio ve arkadaşları tarafından klonlanması ve karakterizasyonu sonucunda, pncA mutasyonlarının PZA direnci sağladığını gösterilmiştir. PZA'ya dirençli klinik izolatların %70'inden fazlasında PncA geni boyunca dağılmış çeşitli mutasyonları tanımlanmıştır. Bununla birlikte mutasyonların çoğu gen boyunca dağılmış olup, genellikle ilgil genin ORF(open reading frame)'nin 561-bp'lik bir bölgesinde veya varsayılan promotörünün 82-bp'lik bir bölgesinde meydana geldiği tespit edilmiştir. Ancak şimdiye kadar mutasyonel hot-spot bölgesi tanımlanamamıştır. Yapılan birkaç çalışmada, pncA'da herhangi bir

mutasyon olmaksızın pirazinamide dirençli suşların ortaya çıktığını bildirmiş ve direncin henüz tanımlanmamış başka bir düzenleyici gendeki mutasyonlardan kaynaklanabileceğini belirtmiştir(73,103,75).

3.7.2. İkinci seçenek ilaçlar

DSÖ'ya göre, aşağıdaki ilaçlar TB tedavisinde kullanılan ikinci seçenek ilaçlar olarak sınıflandırılabilir. Bunlar: aminoglikozitler (kanamisin ve amikasin), polipeptitler (kapreomisin, viomisin ve enviomisin), florokinolonlar (ofloksasin, siprofloksasin ve gatifloksasin), D-sikloserin ve tiyonamidler (etionamid) ve prothionamidler (Dünya Sağlık Örgütü, 2001)'dir. Ne yazık ki, ikinci seçenek ilaçlar doğal olarak birinci seçenek ilaçlardan daha toksik ve daha az etkilidirler (DSÖ, 2001). İkinci seçenek ilaçlar çoğunlukla ÇİD-TB tedavisinde kullanılır ve sonuç olarak toplam tedavi süresini 6 ila 9 ay arasında uzatırlar (104,105).

3.7.2.1. Florokinolonlar

Günümüzde, ÇİD-TB tedavisinde ikinci seçenek ilaçlar olarak kullanılan hem siprofloksasin hem de ofloksasin gibi Florokinolonlar, anti-malaryal klorokinin bir yan ürünü olan nalidiksik asidin sentetik türevleridirler. Moksifloksasin ve gatifloksasin gibi daha yeni nesil kinolonlar klinik çalışmalarda değerlendirilmekte ve TB'de tedavi süresini kısaltmak amacıyla birinci basamak antibiyotikler olarak önerilmektedir(75).

Florokinolonların etki şekli, bakteri canlılığı için hayati bir öneme sahip iki kritik enzim olan topoizomerez II (DNA giraz) ve topoizomerez IV'ü inhibisyonuna dayanır. Bu proteinler sırasıyla *gyrA*, *gyrB*, *parC* ve *parE* genleri tarafından kodlanır. *M. tuberculosis*'te sadece tip II topoizomerez (DNA giraz) enzimi var olduğu için, *M. tuberculosis*'te florokinolon aktivitesi bu enzimin inhibisyonuna dayanmaktadır (106,107).

Tip II topoizomerez, sırasıyla *gyrA* ve *gyrB* tarafından kodlanan ve DNA'nın sürepsarmalını katalize eden iki α ve β alt biriminden oluşan bir tetramerdir. *M. tuberculosis*'te florokinolon direncinin gelişmesinin ana mekanizması, *gyrA* veya *gyrB*'nin kinolon direncini belirleyen bölgesindeki kromozomal mutasyonlardır. En sık rastlanan mutasyonlar *gyrA*'nın 90 ve 94. pozisyonundadır ancak 74, 88 ve 91. pozisyonda mutasyonlar da bildirilmiştir (108,109).

3.7.2.2. Kanamisin, kapreomisin, amikasin, viomisin

Bu dört antibiyotik, aynı etki mekanizmasına sahip olup protein sentezini inhibe ederek etkiyi göstermektedirler, ancak kanamisin ve amikasin aminoglikozitler iken, kapreomisin ve viomycin siklik peptit antibiyotiklerdir. Dördü de ÇİD-TB tedavisinde kullanılan ikinci basamak ilaçlardır(73).

3.7.2.3. Ethionamide

Ethionamide, izoniazide yapısal olarak benzer bir izonikotinic asit türevidir. Aynı zamanda, ethA geni tarafından kodlanan bir monooksijenaz tarafından aktivasyon gerektiren bir ön ilaçtır. Enoil-ACP redüktaz enzimini inhibe eden NAD ile bir eklenti oluşturarak mikolik asit sentezini bozar(75).

3.7.2.4. Para-amino salisilik asit (PAS)

Tüberkülozun tedavisinde kullanılan ilk anti-tüberküloz ilaçlarından biri olmasına rağmen, izoniazid ve streptomisin ile birlikte para-amino salisilik asit veya PAS artık ÇİD-TB tedavi rejiminin ikinci seçenek ilaç grubu olarak kabul edilmektedir. Yakın zamana kadar, etki mekanizması tam olarak tanımlanmamıştı. Para-amino benzoik asidin bir analogu olduğu için, folat sentezini bozarak etkisini gösterdiği ileri sürülmüştür(110).

3.7.2.5. Sikloserin

Sikloserin, ÇİD-TB tedavi rejimlerinde kullanılan oral bakteriyostatik ikinci basamak bir anti-tüberküloz ilacıdır. D-alanin aktivitesini bloke eden bir D-alanin'in analogudur: D-alanin ligaz, peptidoglikan sentezini inhibe eder. Ayrıca L-alanin'in D-alanin'e dönüştürülmesi için gerekli olan D-alanin rasemazını (AlrA) da inhibe edebilir(111)

3.7.2.6. Makrolidler

M. tuberculosis'e karşı sınırlı aktiviteleri nedeniyle daha çok diğer mikobakteriyel enfeksiyonların tedavisi için tavsiye edilir(73).

3.7.3. Yeni anti-TB ilaçları

3.7.3.1. Bedakuilin

Eskiden TMC207 veya R207910 olarak bilinen bedakuilin, *M. tuberculosis*'e karşı spesifik aktiviteye sahip diarilkinolinler sınıfına ait olup aynı zamanda diğer tüberküloz dışı mikobakterilere karşı da in vitro aktivite gösteren yeni bir antibiyotiktir. Bir ATP sentaz inhibitörü olan bedaquilin, antibiyotiklere duyarlı ve dirençli TB'yi ve ayrıca çok çeşitli tüberküloz dışı mikobakterileri de etkileyen geniş spektrumlu bir anti-mikobakteriyel bileşik olarak işlev görür. Bedakuilin'in etki şekli, bir antimikobakteriyel ilaç için tamamen yeni bir etki hedefi olan *M. tuberculosis*'in ATP sentazın proton pompasını inhibe etmesidir(73).

3.7.3.2. Delamanid

Önceden OPC-67683 olarak bilinen Delamanid, *M. tuberculosis*'e karşı mikolik asit sentezini inhibe ederek etki gösteren bir nitro-dihidro-imidazooksazol türevidir ve faz III çalışmasında klinik değerlendirmeden geçmektedir(112). Yapılan bazı çalışmalarla Delamanid'in duyarlı ve dirençli *M. tuberculosis* izolatlarına karşı hem in vitro hem de in vivo aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir(113).

3.8. İlaç Duyarlılığının Belirlenmesi

M. tuberculosis suşlarının anti-tüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan laboratuvar yöntemleri, ya anti-tüberküloz ilacı içeren bir besiyerinde çoğalması ve ya metabolik inhibisyonuna dayanan konvansiyonel fenotipik yöntemler ya da ilaç etkinliği ile ilgili genlerdeki mutasyonların moleküler düzeyde saptanmasıyla gerçekleştirilen moleküler temelli genotipik yöntemler olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılabilir(114).

M. tuberculosis'teki ilaç direncinin primer nedeni, hedef molekülleri ya da dönüştürücü enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen delesyon, insersiyon ve ya nokta mutasyonlarının birikimi sonucu meydana gelmektedir. Bu durum her ne kadar düşük frekansta spontan olarak meydana gelen kromozomal mutasyonlardan kaynaklansa da çoğunlukla yetersiz ve eksik tedavi sırasında spontan ilaç direnci mutasyonlarının yapay seçiliminden kaynaklandığı için insan yapımı olarak kabul edilmektedir(115,116,117).

Birçok ülkede standart kısa süreli tedavi rejiminin yaygın kullanımı ÇİD-TB ve YİD-TB vakaların insidansında artışa neden olmuştur. ÇİD-TB vakaları sadece daha önce uygun olmayan tedavi almış hastalar arasında değil, aynı zamanda toplumdaki bulaş nedeniyle yeni vakalar arasında da tehlikeli bir orana ulaşmış durumdadır. Çoklu ve yaygın ilaca dirençli tüberkülozun ortaya çıkması tüberkülozun tedavisini daha karmaşık ve maliyetli hale getirdiğinden bu hastalığın kontrolünde önemli bir engel oluşturmaktadır. Antitüberküloz ilaç direnci sürveyansının yaygınlaşması ve dünyanın birçok yerinde insidansı artan çoklu ilaç dirençli tüberküloz vakalarının uygun tedavisinde uygulanacak etkili tedavi rejimlerini geliştirmek için *M. tuberculosis*'in anti-tüberküloz ilaçlara duyarlılığını test etmede kullanılacak güvenilir, kısa sürede sonuç veren ve maliyet-etkin yöntemlere olan ihtiyacı ortaya koymaktadır(114).

3.8.1. İlaç duyarlılık testleri

3.8.1.1. Kültüre dayalı yöntemler

Kültüre dayalı fenotipik DST yöntemleri, DSÖ tarafından ilaç direncinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemler, kullandıkları besiyeri ve test sistemlerine göre yumurta veya agar bazlı besiyeri kullanan klasik kültür yöntemleri ya da sıvı bazlı besiyeri kullanan tam veya yarı otomotize hızlı kültür yöntemleri olmak üzere iki gruba ayrılabilirler. Fenotipik DST gerçekleştirmek için mikobakteriler genellikle başlangıçta çeşitli katı veya sıvı kültür ortamlarında çoğaltılırlar. Bu amaçla en sık kullanılan besiyerleri Löwenstein–Jensen (LJ), Middlebrook 7H10 agar (7H10), Middlebrook 7H11 zenginleştirilmiş agar (7H11) ve Middlebrook 7H9 broth'tur. Löwenstein–Jensen (LJ) veya Middlebrook 7H10 agar bazlı besiyerinin kullanıldığı proporsiyon metodu, direnç oranı metodu ve mutlak konsantrasyon metodları en çok kullanılan fenotipik DST yöntemleridir.

Proporsiyon metodu, *M. tuberculosis*'in ilaç duyarlılığının belirlenmesinde yaygın kullanılan referans bir yöntemidir. Bu yöntem primer ve sekonder antitüberküloz ilaç duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan ve uluslar arası otoriteler tarafından kabul görmüş antitüberküloz ilaçların kritik konsantrasyonlarında dirençli organizmaların oranının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde antitüberküloz ajanın kritik konsantrasyonunu(Isoniazid 0.2

mg/L, Rifampicin 40.0 mg/L, Ethambutol 2.0 mg/l, Levofloxacin 2.0 mg/L, Moxifloxacin 1.0 mg/L, Amikacin 30.0 mg/L, Streptomycin 4.0mg/L) içeren LJ ve ya Middlebrook 7H10 agar bazlı besiyerine test edilecek izolatın genellikle MacFarland:1 süspansiyonunun 10^{-2} veya 10^{-4} gibi dilüsyonları inoküle edilir. Antitüberküloz ajan içermeyen kontrol besiyerine bu süspansiyonun 1/100 oranında seyreltilmiş dilüsyonu inoküle edilir. İlaç içeren besiyerinde üreyen dirençli basillerin koloni sayısı, ilaç içermeyen kontrol besiyerindeki koloni sayısına oranı hesaplanır ve orantı yüzde olarak ifade edilir. Test edilen klinik izolatın İlacın kritik konsantrasyonuna dirençli basillerin oranı papulasyon yüzdesi olarak ifade edilir. İlacın kritik konsantrasyonunda bu oran %1 veya daha fazla ise test edilen klinik izolat o ilaca karşı dirençli olarak kabul edilir. Duyarlı izolatlar için ön sonuçlar 3-4 haftalık inkübasyondan sonra okunabilir; kesin sonuçlar ise 6 haftalık inkübasyondan sonra okunabilir^(118,3). Belirli anti-TB ilaçlar için kültüre dayalı fenotipik DST yöntemleri güvenilir ve tekrarlanabilir olmalarına rağmen bu yöntemlerin zaman alıcı olmaları, karmaşık laboratuvar altyapısı gerektirmeleri, kalifiye personel ve sıkı kalite kontrol gerektirmeleri nedeniyle rutinde pek kullanılmazlar.

Mutlak konsantrasyon ve direnç oranı yöntemleri gibi diğer yöntemler, ek kontroller ve standart bir inokülüm gerektirir. Bu yöntemler tüm antitüberküloz ajanlar için yeterince değerlendirilmediğinden, şu anda DSÖ tarafından kullanımları önerilmemektedir⁽¹¹⁸⁾.

3.8.1.2. Hızlı duyarlılık testleri

Sıvı bazlı besiyeri kullanan sistemler hem mikobakterilerin klinik örneklerden primer izolasyonlarında, hem de antitüberküloz ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılabilir. DST için kullanılan sıvı bazlı kültür sistemleri, katı besiyeri kullanan sistemlerle göre göre daha duyarlı olup daha hızlı sonuç vermektedir. Tüberkülozun efektif tedavisini gerçekleştirmek ve uygun olmayan tedavi sonucu gelişebilecek ilaç direncini engellemek için hızlı ve güvenli antimikrobiyal duyarlılık testlerini gerçekleştirmek zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Haziran 2007'de DSÖ'de özellikle kaynakları sınırlı ülkelerde HIV ile ilişkili TB'nin yayılımını engellemek ve çoklu ilaca dirençli suşların yayılımını sınırlandırmak için Mikobakterilerin

laboratuvar kültürlerinin yapılmasında ve ilaç duyarlılığının belirlenmesinde katı besiyerleriyle beraber sıvı bazlı besiyerlerin de kullanımını tavsiye etmiştir(119).

Mikobakterilerin ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılan bu yöntemler Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri veya modifikasyonlarını kullanan ticari tam otomatize veya yarı otomatize kültür sistemleridir. Bunlar; Floresan Kültür Sistemi(BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube [MGIT] System 960, Kolorimetrik Kültür Sistemi(BacT/Alert 3D, bioMerieux, Durham, NC, USA), Radyometrik Kültür Sistemi(BACTEC 460 TB, BectonDickinson, Sparks, MD), Gaz Basınç Değişimini Saptayan Kültür Sistemi(VersaTREK, AccuMed, Chicago, Ill.) dir. Bu sıvı besiyeri kullanan sistemlerden BACTEC 460 TB radyometrik sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks) altın standart olarak kabul edilen agar proporsiyon yönteminin modifiye bir versiyonu olup Mikobakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılan ilk otomatize sistemdir. Proporsiyon yöntemiyle karşılaştırıldığında sonuç alma süresini ortalama 21 günden 5-6 güne kadar indirmesiyle ciddi bir zaman tasarrufu sağlamıştır. Ancak radyoaktif madde kullanımı gerektirdiğinden bu alanda çalışan araştırmacıların birçok alternatif sistemler geliştirmelerine yöneltmiştir. Bu sistemlerden DSÖ tarafından kullanım onayı almış ve fenotipik ilaç duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan MGIT 960 sistemi tam otomatize bir sistem olup mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kolayca kullanılan en yaygın sistemlerden biridir(6,120).

3.8.1.3. Floresan kültür sistemi (BACTEC) Mycobacterium Growth Indicator Tube [MGIT] System 960

Besiyeri olarak Middlebrook 7H9 sıvı bazlı besiyeri kullanan BACTEC MGIT 960 sistemi kan hariç tüm klinik örneklerden mikobakterilerin izolasyonlarında kullanıldığı gibi, bu bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde de kullanılabilen non-radyometrik tam otomatize bir sistemdir. MGIT 960 sistemi, modifiye Middlebrook 7H9 besiyerini içeren tüplerdeki mikobakteriyel çoğalmanın neden olduğu floresans değişimini saptamaya dayanır. Tüpün dip kısmındaki silikona gömülü, oksijene bağlı bir florofofor(rutenyum metal kompleksi) içeren tüplerdeki bakterilerin çoğalırken ayırtmış olduğu bu kompleksteki florofoforun serbest kalması sonucunda ortaya çıkan floresans ölçümüne dayanır. Üreme sonucunda

Oluşan floresans miktarı bir sensör tarafından algılanmakta ve “üreme indeksi (Growth Unit)” olarak ölçülmektedir. Aksi durumda üreme gerçekleşmediğinde oksijen tüketimi gerçekleşmez dolayısıyla floresans madde serbest kalmadığı için ortama gönderilen ultraviyole (UV) ışını floresans oluşumuna neden olmaz böylelikle mikobakteri üremediği anlaşılmış olur.

Bactec MGIT 960 sistemi ile klinik örneklerden mikobakteriler izole edildikten sonra tüberküloz tedavisinde kullanılan streptomisin, izoniazid, rifampisin ve etambutol’un belirlenen bir konsantrasyonunun mikobakterilere karşı etkinliği kalitatif olarak saptanmaktadır. Bu sistemin çalışma prensibi, BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan besiyerinde en az 1-5 gün önce üremiş olan stok bakteri solüsyonundan 0.5 ml alınarak, içerisine suplament(0.8 ml) ve test edilen antitüberküloz ilacın(0.1 ml) belirlenmiş konsantrasyonu eklenmiş MGIT tüplerine inoküle edilir. Ayrıca kontrol tüpü olarak hazırlanmış ve içerisine test edilecek ilaç eklenmemiş tüplere 1:100 oranında seyreltilmiş bakteri süspansiyonu eklenerek cihaza yerleştirilir. İlaç içeren tüp ile ilaçsız kontrol tüpü arasındaki nispi çoğalma oranı, sistemin yazılım algoritması tarafından belirlenir. İlaç içeren tüpteki nispi çoğalma kontrol tüpününkine eşit veya daha fazlaysa, izolat ilaca dirençli olarak kabul edilir; nisbi çoğalma kontrol tüpündekinden daha az ise, izolat ilaca duyarlı olarak kabul edilir(121).

3.8.1.4. Moleküler yöntemler

M. tuberculosis suşlarında ilaç direncinin saptanmasına yönelik geleneksel yöntemler, kültür yoluyla izolasyona ve ardından klinik izolatların ilaç duyarlılık testine (İDT) dayanır. *M. tuberculosis*’in çok yavaş jenerasyon zamanı nedeniyle, bu yöntemler zaman alıcıdır ve duyarlılık testlerinin gerçekleştirilmesi birkaç haftalık süre gerektirebilir. Özellikle ilaca dirençli TB vakalarında etyolojik ajanın tespiti, identifikasyonu ve ilaç duyarlılığının belirlenmesi için hem spesifitesi ve sensitivitesi yüksek hem de zamandan tasarruf sağlayan yöntemlerin kullanılması bu hastaların etkili tedavi almasını ve bulaşıcılığının engellenmesini sağlamada kritik bir öneme sahiptir.

Antitüberküloz ilaçlara direncin moleküler tanısı doğrudan klinik örneklerde bulunan veya invitro kültürlerde üremiş *M.tuberculosis* suşlarındaki direnç gelişimi

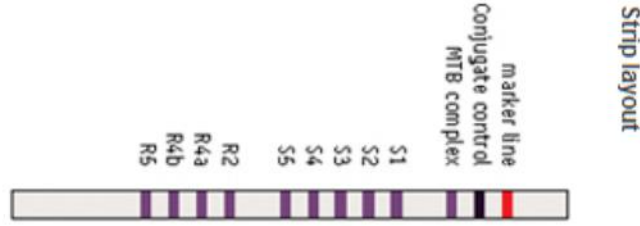
ile ilgili genlerdeki en yaygın mutasyonların tespitine dayanır. Bu mutasyonlar ya antibiyotiklerin hedef moleküllerini kodlayan genlerde veya pre-antibiyotik maddelerin dönüşümünü sağlayan enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar olup mikobakterilerde ilaç direnci gelişimine neden olur. Bu moleküler yöntemlerle direncin belirlenmesi iki adımda gerçekleştirilmektedir: ilk olarak, özel olarak tasarlanmış dirençle ilgili genlere spesifik primerler kullanılarak ilgili DNA segmentinin PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir, ardından hibridizasyon veya dizileme ile amplifiye edilmiş genlerdeki spesifik mutasyonlar, hibridizasyon veya DNA dizi analizi ile belirlenir.

Günümüzde mikobakterilerde ilaç direncinin saptanmasında kullanılan çok sayıda ticari ve laboratuvar tasarımlı moleküler metot geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden Line Prob Assay(LPA), GeneXpert MTB/RIF assay(Cepheid, California, USA), loop-mediated isothermal amplification test (TB-LAMP; Eiken Chemical, Tokyo, Japan), Truenat™ MTB, MTB Plus and MTBRIF Dx tests (Molbio Diagnostics, Goa, India) ve DNA sekans analizi metotları en çok kullanılan yöntemler olup, DSÖ tarafından mikobakterilerde ilaç duyarlılıkların belirlenmesi için kullanım onayı almışlardır(122,6).

3.8.1.5. Line prob assay (LPA)

INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium), klinik örneklerden *M.tuberculosis* DNA'sı ve ilgili direnç bölgelerini amplifiye ederek aynı anda saptayabilen nükleik asit amplifikasyon tabanlı bir test sistemidir. *M. tuberculosis* suşlarında RIF direnci, RNA polimerazın bir beta alt birimini kodlayan rpo B geninin hypervariable bölgesi içindeki çeşitli mutasyonlar grubu tarafından verilir ve RIF dirençli izolatların yaklaşık %95'inden fazlası bu hypervariable bölge içinde mutasyonlara sahiptir(2,3)LiPA RIF TB testi sonuçların özetlenmiş olduğu bir meta analiz çalışması, mikobakteri kültüründen elde edilmiş bakterilerle çalışıldığında, LiPA RIF TB testinin %95 duyarlılık ve %100 özgüllüğe sahip olduğu belirlenmiştir. Klinik örneklerle doğrudan uygulandığında %80-100 arasında bir duyarlılığa, %100 özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir. *M.tuberculosis*'in tespiti ve ilaç duyarlılığının belirlenmesinde hızlı ve doğru bir tanı testi olmasına rağmen, LiPA teknolojisine dayalı testler yüksek maliyetleri ve sofistike test sistemleri nedeniyle sınırlı

kaynaklara sahip gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak kullanılmamaktadırlar(122,123,124).



Şekil 6. İNNO lipa test stribi(125)

3.8.1.6. GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Germany) testi

Doğrudan klinik örneklerden veya kültürden MTBK üyelerinin tanımlanması ile RİF ve İNH direncine neden olan genlerdeki mutasyonları eşzamanlı olarak tespiti için Multiplex PCR ile ters hibridizasyona dayanan prob teknolojisini birleştiren bir DNA Line Probe testidir. RİF ile İNH direncini eş zamanlı olarak saptayabilen bir test olduğundan ÇİD-TB tanısında yaygın kullanılan bu ticari bir test sisteminde, multiplex PCR ile çoğaltılan spesifik DNA amplikonları daha sonra membrana bağlı problara hibridize edilerek MTBK üyeleri ve bunların ilaç direnci saptanmaya çalışılır. Ters hibridizasyon temeline dayalı bu test sistemi RİF direncine neden olan ve RNA polimerazın Beta alt ünitesini kodlayan rpoB genin 81 bp'lik “core” bölgesinde bulunan mutasyonları hedef alırken, İNH direncine neden olan ve katalaz peroksidaz enzimini kodlayan katG geni ile NADH enoyl-acyl carrier protein (acp) reductase enzimini kodlayan inhA geni promotor bölgesindeki dirençle ilgili en yaygın mutasyonları hedef alır(14,15). Multiplex PCR ile çoğaltılan amplikonlar, membrana bağlı ve rpoB geninin RRDR(rifampin resistance determining region) bölgesi ile örtüşen sekizi duyarlı wild type-WT prob, 4'ü rpoB genindeki Asp516Val, His526Tyr, His526Asp ve Ser531Leu mutasyonları içeren problarla ters hibridizasyonu gerçekleştirilir(Şekil 7.). RİF ve İNH direncinin varlığı wild type-WT problarda hibridizasyonun gerçekleşmemesi ve spesifik mutasyonu temsil eden proba hibridizasyon sonucu oluşan DNA sinyal bantlarının görünmesi direncin varlığı olarak yorumlanır (Şekil 8.) (126,127,88).

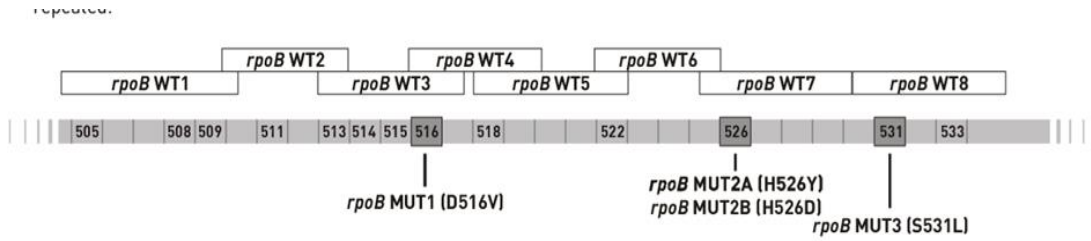
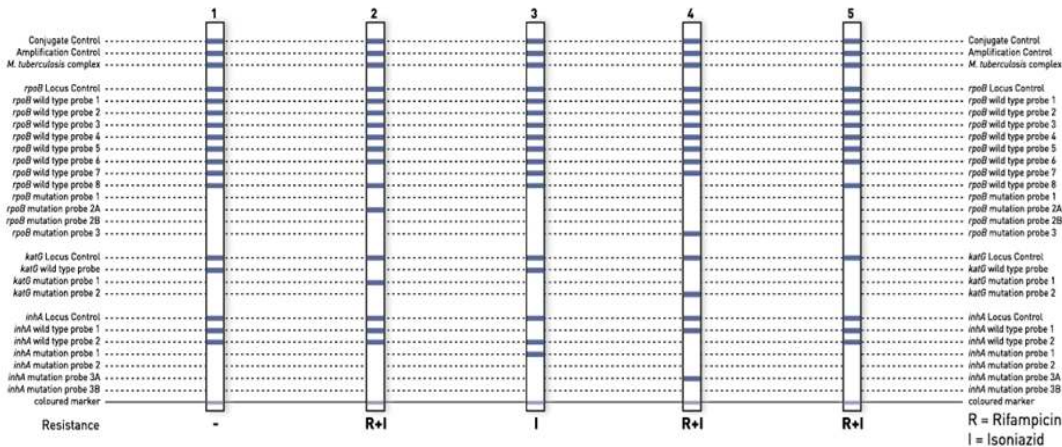


Figure 1: RMP resistance region of the *rpoB* gene

Şekil 7. Genotip MTBDRplus *rpoB* geninin Rifampisin direncinden sorumlu bölgelerin tespitinde kullanılan probolar(128)

Konvansiyonel yöntemlere göre 48 saat gibi kısa geri dönüş süresi ile iyi bir duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olan MTBDRplus testi, ÇİD-TB'nin hızlı tanısı için yararlı bir araç olabilir. GenoType MTBDRplus testi ile fenotipik ilaç duyarlılık testlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda bu testin RİF direncini saptamada %98-100 ve %-95-97,3 duyarlılık ve özgüllüğe, İNH direncini saptamada %-86-91,9 ve %90-98,4 duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu belirlenmiştir (129,130,131,132).



Şekil 8. MTBDRplus strip görüntüsü ve hibridizasyon sonrası direnç analizi

3.8.1.7. GeneXpert MTB/RIF assay(Cepheid, California, USA)

DSÖ'den onay almış, pulmoner ve extra pulmoner klinik örneklerden eşzamanlı olarak hem *M. tuberculosis*'in varlığını hem de RIF-R'nin yaklaşık %95'inden sorumlu mutasyonları saptamada kullanılan bir moleküler tanı testidir. *GeneXpert* testi, RİF ilaç direncine neden olan mutasyonlarla birlikte MTBK'yı tespit etmek için *rpoB* geninin 81 bp'lik RRDR(rifampicin resistance determining region) hedef bölgesine özgü, aynı multiplex reaksiyonda gendeki farklı hedef sekanslarının tamamlayıcısı olan ve farklı renkli bir florofofor ile işaretlenmiş, beş farklı nükleik asit probu(A-E) kullanan, kartuş tabanlı, otomatik semi-nested real-time PCR sistemidir.

Bu beş farklı prob, rpoB geninin rifampicin resistance determining region(RRDR) bölgesindeki A (kodonlar 507-511), B (kodonlar 512-518), C (kodonlar 518-523), D (523-529 kodonları) ve E (kodonlar 529-533) sekanslara hibridize olur (Şekil 9.) (127,133).



Şekil 9. GeneXpert prob hedef dizileri

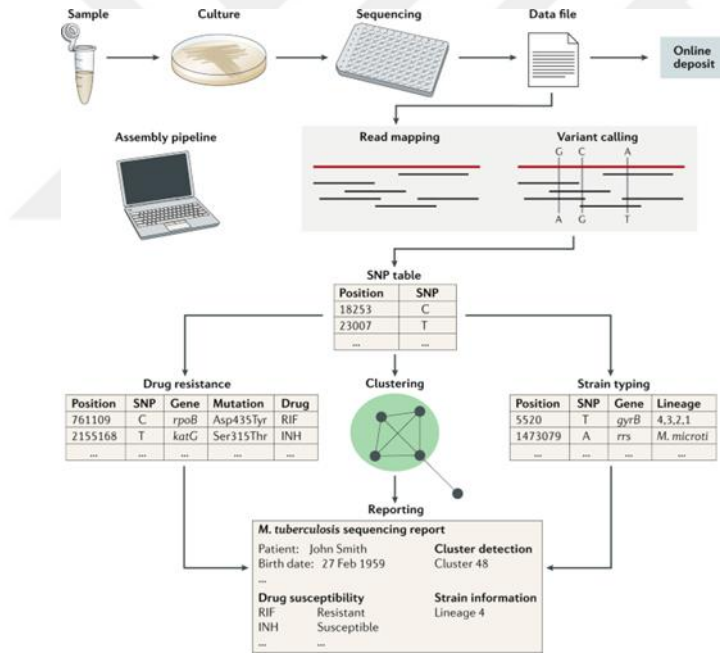
MTBK varlığının pozitif olarak kabul edilebilmesi için, beş probdan en az ikisinin bir döngü eşiği (Cycle thresholf=Ct) ≤ 38 göstermesi gerekir. Bir veya daha fazla probun hibridizasyonu göstermeyen herhangi bir suş veya ilk ve son Ct arasındaki fark 3.5'ten fazla olduğunda ise RR-TB pozitif olarak değerlendirilir (127,134).

3.8.2. Genom dizi analizi yöntemleri

M.tuberculosis izolatlarının anti-tüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının zamanında ve doğru bir şekilde belirlenmesi özellikle ÇİD-TB'nin toplumlarda yayılmasını engellemek ve etkili tedaviye erişim için hayati bir öneme sahiptir. *M.tuberculosis*'in laboratuvar ortamında konvansiyonel yöntemlerle tanısı ve ilaç duyarlılığının belirlenmesinin uzun zaman alması, tüberküloza karşı verilen küresel mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Son yıllarda ilaç duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan hızlı fenotipik yöntemler ve GeneXpert MTB/RIF assay(Cepheid, California, USA), GenoType MTBDRplus(Hain Lifescience, Nehren, Germany) gibi moleküler testler, mikobakteriyel türleri ve dirence neden olan mutasyonları bir günden az gibi bir zaman içerisinde saptayabilmelerine rağmen, direnç kazandıran tüm mutasyonları tespit edememeleri ve çoğunlukla kültürden sonra uygulanmaları bu testlerin dezavantajlarını oluşturmaktadır(135).

M.tuberculosis izolatlarının kromozom dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi ve ilaç direnciyle ilgili mutasyonların saptanması geleneksel fenotipik testlerle ilişkili birçok önemli zorluğun yanı sıra, prob tabanlı moleküler testlerinin sınırlamalarını da ortadan kaldırmıştır. Birden fazla gen gölgesi veya tüm genomun ayrıntılı dizi analizi

(Whole genome sequencing=WGS), MTBK üyelerinin ilaç direnç profilleri, genetik çeşitliliği ve bulaş dinamiklerini belirlemede büyük kolaylıklar sağlamıştır(136). *M. tuberculosis*'in ilaç direnç profilinin belirlenmesinde WGS yönteminin kullanılması, dirence neden olan ve farklı kromozomal bölgelerde bulunan ilgili mutasyonların saptanmasını kolaylaştırmıştır. Yapılan çalışmalar, WGS'nin *M.tuberculosis* için ilaca direnç fenotipinin güvenli bir şekilde tahmin edilmesi için potansiyel olarak önemli olan Single nucleotide polymorphism (SNP) ve insertion-delesyonlar gibi farklı genetik polimorfizleri belirleme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. *M. tuberculosis*'in tüm genom dizilimin belirlenmesinden yaklaşık yirmi yıl sonra yeni nesil dizilime teknolojilerinin (next generation sequencing =NGS) ortaya çıkmasıyla, tüm genom dizilimi(WGS) yöntemleri *M.tuberculosis*'in tanısında, ilaç direncinin belirlenmesinde ve genotiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 10) (81,137).



Şekil 10. WGS yönteminin *M.tuberculosis* ile ilgili kullanım alanları(138).

Günümüzde genom baz dizilimin belirlenmesinde kullanılan sanger'in dideoksinükleotid yöntemine dayalı zincir sonlandırma dizileme metodu, otomatize sistemlerin kullanıma girmesiyle daha pratik ve kolay uygulanabilir hale geldiği için araştırma laboratuvarlarında geniş kullanım alanı bulmuştur. Bu zincir sonlandırma metodu, tek zincirli bir DNA kalıbı, dizi analizi yapılacak bölgeye özgü primerler, DNA polimeraz enzimi, floresan boyalı normal deoksinükleotit trifosfatlar(dNTP) ve

DNA zincir uzamasını sonlandıran modifiye edilmiş dideoksinükleotit trifosfatlar (ddNTP) gerektirir. DNA zincirinin uzayan ucundaki nükleotitlere dNTP'ler eklendiğinde zincir uzaması devam ederken, İki nükleotit arasında fosfodiester bağının oluşumu için gerekli olan 3'-OH grubundan yoksun olan bu modifiye nükleotitlerin (ddATP, ddGTP, ddCTP ve ddTTP) eklenmesi durumunda uzama reaksiyonu durmakta ve her biri farklı floresan işaretli modifiye nükleotitle sonlanmaktadır. Farklı modifiye nükleotitlerle sonlanmış DNA sekansları kapiller jel elektroforezinde yürütülürken, her bir sekansta bulunan modifiye ddNTP'lerin yaymış olduğu farklı dalga boyundaki floresans ışımalar sensörler tarafından algılanarak özel bir bilgisayar program tarafından DNA dizilerine dönüştürülür(139,140).

Günümüzde *M. tuberculosis* suşlarının Klinik örneklerden saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler nükleik asit(DNA ve ya RNA) amplifikasyon temelli yöntemler ve nükleik asit hibridizasyon temelli yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır. Tüberkülozun laboratuvar tanısında kullanılan Moleküler testler çoğu polimeraz zincir reaksiyonu(PCR) gibi amplifikasyon temelli yöntemleri kullanarak klinik örneklerden doğrudan ya da kültürde üretilmiş bulunan *M.tuberculosis*'e özgü nükleik asitlerin(DNA veya RNA) saptanmasını veya dizileme, nükleik asit hibridizasyon gibi yöntemlerle anti-tüberküloz ilaçlarla ilgili gen mutasyonlarının saptanmasını amaçlar(141).

TB'nin laboratuvar tanısında kullanılan konvansiyonel yöntemlerin çeşitli sınırlılıkları bulunduğundan dolayı nükleik asit amplifikasyon testleri(NAAT) geleneksel mikrobiyolojik tanımlamaya bir alternatif veya tamamlayıcı olarak ortaya. Klasik PCR, Nested-PCR, reverse-transcription (RT)-PCR ve TB loop-mediated isothermal amplification (LAMP) gibi Nükleik asit amplifikasyonuna dayalı sistemler MTBK suşlarının nükleik asitlerinin spesifik bölgeleriyle hibridize olabilen moleküler probalar kullanır. Bu sistemler MTBK organizmalarının IS 6110 insersiyon dizisi, 16S rRNA ve ya 23S rRNA'sını hem yayma pozitif hem de yayma negatif klinik örneklerden doğrudan saptayabilir. Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında 16S rRNA, hps65, rpoB ve daha bir çok spesifik gen bölgesini hedef alan bu sistemler, klinik örneklerde 1×10^5 basil/ml varlığında neredeyse %100 duyarlılık ve özgüllüğe sahip olup, mikroskopik tanıdan daha iyi ve kültürden daha

hızlı sonuçlar vermektedirler. Yapılan bir çalışmada IS6110 tabanlı PCR ile BACTEC MGIT 960 sistemi arasında %100'lük bir korelasyon bulunmuş ve yazarlar her iki yöntemin rutin klinik tanı için birleşik bir protokol olarak kullanılmasını önermişlerdir. Yayma negatif örneklerde NAAT sistemlerinin özgüllüğü yüksek olsa da duyarlılığının düşük olduğu bulunmuştur(141,142,143).

Günümüzde *M.tuberculosis*'in moleküler tanısında ve ilaç direncinin belirlenmesinde DSÖ tarafından önerilen real-time PCR temelli birçok ticari testler bulunmaktadır (Tablo 1). Şu anda DSÖ tarafından onaylanan ve Tüberkülozun hızlı laboratuvar tanısında kullanılan Xpert MTB/RIF (Cepheid, ABD) testi ve Birleşik Devletler(USA) Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve ARB yayması pozitif numuneleri test etmek için kullanılan Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct (MTD) Testi(Gen-Probe, San Diego, CA, USA), ve Amplicor *Mycobacterium tuberculosis*(Roche Molecular Systems, Inc) ticari nükleik asit amplifikasyon Test sistemleri bulunmaktadır. Xpert MTB/RIF (Cepheid, ABD) testi doğrudan klinik örneklerden tüberküloz tanısı ve *M. tuberculosis* genomunda rifampisin direncini kısa sürede tanımlayabilen otomatik bir sistem olup, TB basilini tanımlamada yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olması nedeniyle birçok laboratuvar da rutin olarak kullanılmaktadır(144,145).

Tablo 1. *M.tuberculosis*'in laboratuvar tanısında kullanılan DSÖ tarafından onaylanmış moleküler ticari testler(146).

Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri - Real-time PCR Temelli Tanı ve Direnç Saptama Testleri
Xpert MTB/RIF (Cepheid, ABD)
Fluorotype MTBDR (Hain Lifescience, Almanya)
Anyples II MTB/MDR/XDR (Seegene, Güney Kore)
LCx MTB RIF/INH (Abbott Laboratories, ABD)
Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri - Line Probe Assay (LPA) Temelli Tanı ve Direnç Saptama Testleri
InnoLipa RIF-TB (Innogenetics, Belçika)
MTBDRplus and MTBDRsl (Hain Lifescience, Almanya)
AID TB resistance LPA (AID Diagnostika, Almanya)
Lipa Nipro NTMs+MDRTB assay (Nipro Company, Japonya)

3.8.3. Moleküler epidemiyoloji

M. tuberculosis'in klinik izolatları arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesi ve TB'nin toplumdaki iletimin dinamiklerini anlamak için moleküler yöntemlerin bu alana uygulanmasına ilk olarak 1980'lerin ortalarında başlanılmıştır. Etiyolojik ajanların koloni morfolojisi, üreme hızları, antibiyotik duyarlılıkları, faj tiplendirilmesi gibi geleneksel yöntemler, klinik izolatların ayırımı yararlı metotlar olmalarına rağmen, sınırlı ayırım gücüne sahip olduklarından TB'nin moleküler epidemiyolojik çalışmaları için kullanımları sınırlı olmuştur. Yani moleküler metotların bu alana uygulanmasından önce tüberkülozun iletim dinamiklerini belirlemek, gözlemsel verilere veya anekdot korelasyonlarına dayanıyordu. Günümüzde moleküler epidemiyolojik çalışmalar için birçok yöntem geliştirilmiş olduğu göz önüne alındığında, TB'nin yayılım dinamiklerini anlaşılması, salgınların ortaya çıkarılması ve klinik izolatlar arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesi için uygun yöntemin seçimi önem arz etmektedir. Genel olarak TB'nin moleküler epidemiyolojik çalışmaları için yöntem seçimindeki kilit nokta polulasyondaki suşların genetik çeşitliliği ve gözlemlenen polimorfizm oranına dayanır. Yani, bir biyomarkırın(özgün sekanslar, duplikasyonlar, delesyonlar, nötr SNP veya IS6110 ile bağlantılı polimorfizmler) değişim hızı, epidemiyolojik olarak ilişkili olmayan suşları ayırt etmek için yeterli olmalı ve yine de ilgili vakaları güvenilir bir şekilde ilişkilendirmek için yeterince kararlı olmalıdır. Genel olarak TB epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalarda moleküler epidemiyolojik yöntemler seçilirken veya veriler değerlendirilirken bu arka plan dikkate alınmalıdır(147).

3.8.4. *M. tuberculosis* kompleksinin genotiplenmesinde kullanılan moleküler yöntemler

3.8.4.1. RFLP

İnsersiyon dizileri(Insertion sequence=IS) çoğu bakteri genomunda dağılmış olarak bulunan, genellikle 2,5 kb'den küçük mobil genetik elementlerdir. IS elementleri transpozonların aksine, sadece kendileri ile ilgili yerdeğiştirme ve düzenleme bilgisini taşımazlar. Aynı zamanda antibiyotik direnci gibi karakterleri kodlayan genleri de taşırlar. IS elemnetlerinin trasnpozisyonu sıklıkla güçlü polar etkilere sahip olup, bitişik genlerin aktivasyonu veya gen ifadesi değişiminde de

neden olabilirler. Bakteri türlerinde farklı tip ve sayıda IS elementi ve bunların kopyaları bulunmaktadır(147).

Bu mobil genetik elementlerden biri olan ve IS3 familyasına mensup IS6110 insersiyon dizisi MTBK üyelerinde tanımlanmış 1,335 bp içeren bir mobil genetik element olup, kopya sayıları ve entegrasyon bölgeleri suşlara göre değişkenlik göstermektedir. Bu varyasyonlar suşların ayırımında sıklıkla kullanılan genetik polimorfizmin temelini oluşturmaktadır. IS6110 kopyaları olmayan bazı suşlar tanımlanmış olmasına rağmen, *M. tuberculosis* klinik izolatlarının genomlarında 1-25 kadar değişen sayıda kopyaları olduğu tespit edilmiştir(148).

Epidemiyolojik araştırmalar için yeterince stabil olduğu için, IS6110 polimorfizmine dayalı çeşitli moleküler biyolojik teknikler geliştirilmiştir. (149,150). Bu yöntemlerden biri IS6110 tabanlı Southern blot hibridizasyon analizini gerçekleştirmek için standartlaştırılmış bir yöntem olan IS6110 RFLP yöntemidir. IS6110 RFLP, farklı araştırmacılar tarafından MTBC DNA'sında bulunan insersiyon dizisinin kopyalarının tanımlanmasının ardından geliştirilmiştir. Bu metod Van Embden ve arkadaşlarının önerilerine göre standardize edilmiş olup kısaca; *M. tuberculosis* genomunda bulunan IS6110 bölgeleri bir restriksiyon endonükleaz olan PvuII enzimi ile kesilir. Elde edilen fragmentler büyüklüklerine göre agaroz jeller üzerinde elektroforetik olarak sperasyonları gerçekleştirildikten sonra, suşa özgü DNA parmak izlerini oluşturmak için IS6110 probu ile Southern blotlama hibridizasyonu gerçekleştirilir. DNA fragmentlerini görülür hale getirmek için kemilüminesan kitler kullanılır. Test edilen suşlardaki Oluşan bantlar *M.tuberculosis* izolatlarının genomlarındaki IS6110 elementlerinin sayı ve konumlarındaki değişkenliği yansıtır(151).

IS6110 RFLP yüksek ayırım gücüne sahip olmasına rağmen, diğer genotipleme yöntemlerinde olduğu gibi bazı sınırlamalara sahiptir. İşlemlerin uzun ve zaman alıcı olması, yoğun miktarda DNA' ya ihtiyaç duyması, Standardizasyona rağmen nispeten karmaşık olabilen bantlama modellerinin karşılaştırılmasının zor olması, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında daha fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması gibi sınırlamalar yöntemin yaygın kullanım alanı bulmasını zorlaştırmıştır. Bazı *M.tuberculosis* alt soylarının ya hiç IS6110 elementi içermemesi ya da beşten az

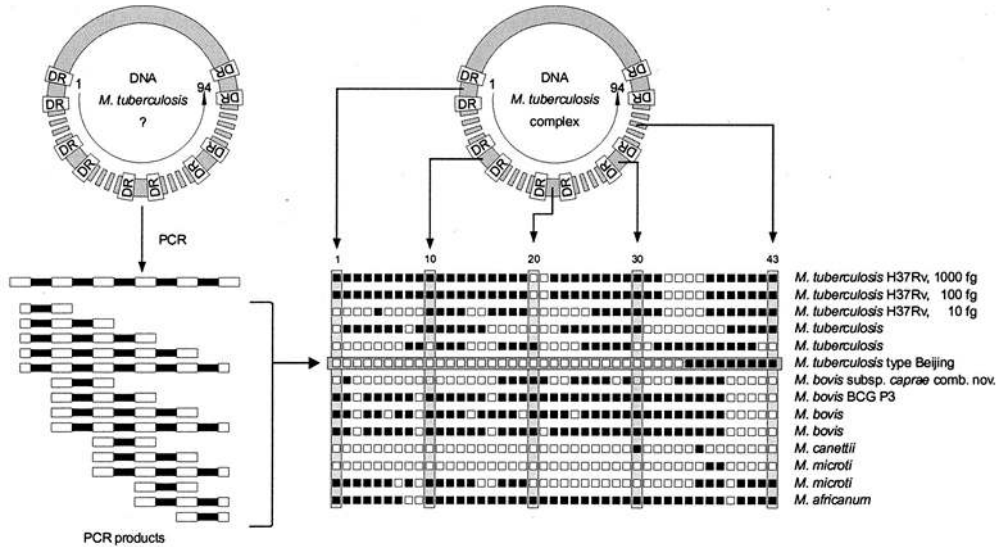
kopya içermesi gibi yöntemin ayırım gücünü azaltan durumların olması, bu alanda çalışan araştırmacıların, PCR tabanlı alternatif genotipleme yöntemlerinin araştırılmasına teşvik etmiştir(147,151,152).

3.8.4.2. Spoligotipleme

Spoligotiplendirme metodu, MTBK üyelerinin moleküler epidemiyolojisi, populasyon genetiği ve evrimi ile ilgili çalışmalarda en çok kullanılan ilk PCR-tabanlı genotiplendirme yöntemlerinden biridir(153). Bu yöntem hemen hemen tüm MTBK üyelerinde bulunan Direct-Variant Repeat (DvR) lokusları olarak adlandırılan belirli bir genomik bölgelerdeki polimorfizmleri hedef alır(154). Direct-Variant Repeat (DvR) lokusları, benzer boyutta(34–41 bp) tekrarlamayan özgün nükleotit dizileri(spacer)ile düzenli aralıkla bölünmüş 21-37 nükleotit Uzunluğunda palindromik tekrar kümelerinden(DR) meydana gelmiş olup, düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR=Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) ailesinin üyesidirler. Direct variable repeat'lerin (DVR) sayısı ve spacer bölgelerinin sekans dizilimleri her bakteri suşuna özgü olup, bakteriler arasında farklılık göstermektedir. Bu yöntem, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks genomunda bulunan direct variable repeat'lerin (DVR) suşa özgü spacer sayısının ve bu birimlerdeki DNA polimorfizmlerinin saptanmasına dayanır (Şekil 11) (152,155).

Bir izolatta bulunan DR lokusuna özgü biotinlenmiş primerler çiftleri kullanılarak PCR ile amplifiye edilir. Elde edilen ampliconlar daha sonra test edilen izolatta her bir referans spacer in varlığını veya yokluğunu ortaya çıkarmak için bir membrana bağlanmış ve özgün spacer bölgelerinin komplementeri olan 43 farklı sentetik oligonükleotit proba hibridize edilir. Hibridizasyon desenlerini görüntülemek için floresans emisyonuyla sonuçlanan ikinci bir antikor kullanılarak spacerlerin varlığı membranda görselleştirilir. Floresans sinyallerine bakılarak 43 spacer diziliminin varlığı ve ya yokluğu dijital ortamda belirlenerek o izolat için bir spoligotipleme deseni elde edilir. Sonuçlar oktal kodlama sistemi kullanılarak “oktal kod” formatına çevrilerek dijitalleştirilir. 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan bu oktal kodlar SITVIT2 veritabanına(<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>) girilerek test edilen izolatlara ait Spoligotype International Type(SIT) numaraları

elde edilir. SIT numaraları, SpolDB4 verileriyle karşılaştırılarak kümeler ve majör familyalar (clade) belirlenir(156,1).



Şekil 11. CRISPR bölgesinin DNA dizisine türlere özgü spacer bölgeleri(157)

Avantajlarına rağmen, Spoligotipleme, MTBK izolatlarının tür düzeyinde tanımlanmasına olanak sağlamazken, bunun yerine bazı özgün spacerlerin varlığına dayalı olarak alt-tür düzeyinde tanımlanmasına olanak sağlar. Örneğin, *M. tuberculosis* spoligotipleri 33-36 spacerlarının olmaması ile karakterize edilirken, *M. bovis* spoligotipleri genellikle 39-43 spacerlarına ve *M. bovis* BCG'de 3, 9, ve 16. spacerlara sahip değildir. Ayrıca, spoligotipleme, klinik ve epidemiyolojik önemi olan genotiplerin tanımlanmasına da olanak sağlar. Uç bir örnek olarak Pekin bölgesinde, Asya'nın diğer bölgelerinde, eski Sovyetler Birliği'nde ve diğer coğrafi bölgelerde yaygın olarak karşılaşılan "Beijing" genotip suşlarının çoğu, yalnızca 43 sentetik oligonükleotit prob bulunan paneldeki son 9 spacer (35-43) ile hibridizasyona girer(152,158)

Spoligotipleme metodu, sonuçların doğru ve tekrarlanabilir olan, nispeten basit, uygun maliyetli ve kısa sürede sonuç alınabilen yüksek verimli bir yöntemdir. Sonuçların doğruluğu DR lokuslarının stabilitesine bağlıdır. Spoligotipleme yönteminin önemli bir avantajı da 2-3 bakteri hücresinden elde edilen DNA'ya eşdeğer 10 fg kromozomal DNA'nın yeterli olması ve aynı zamanda saf olmayan örneklerden cansız numunelerden, parafine gömülmüş materyalden ve ARB pozitif boyanmış yayma örneklerinden çalışılabilmesidir. Elde edilen verilerin ikili

(mevcut/yok) formatı ve bu ikili verilerin oktal kodlara çevrilerek dijital ortama aktarılması, ayrıca sonuçların farklı laboratuvar ortamlarında yapılan çalışmalarla karşılaştırılabilir olması yöntemin bir diğer avantajını oluşturmaktadır(50,155).

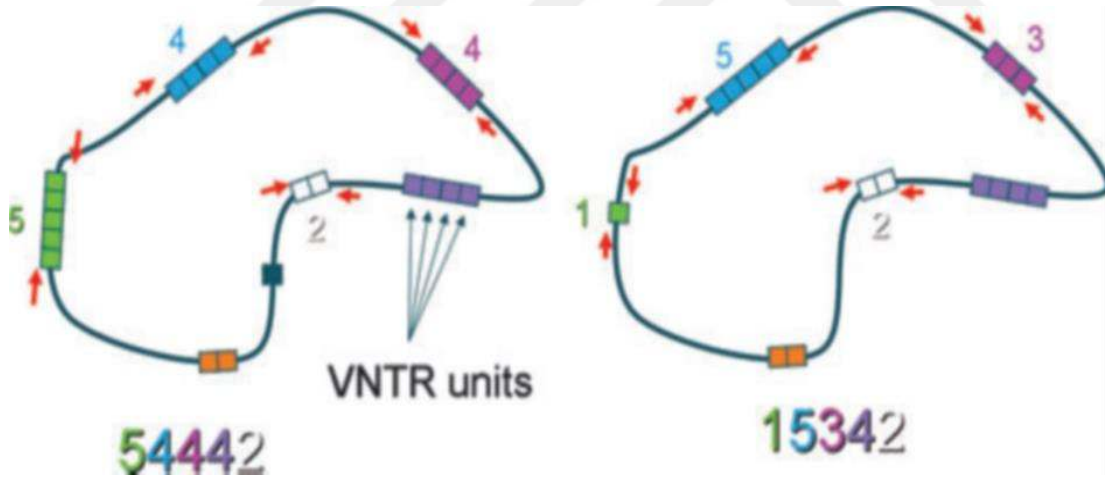
Yapılan farklı çalışmalarda, spoligotipleme metodunun, IS6110 RFLP tiplendirme metodundan daha düşük düzeyde bir ayırım kapasitesine(discrimination) sahip olduğu ortaya konulmuştur (106– 110). Bunun temel nedeni IS6110 tabanlı RFLP analizi tüm genom boyunca dağılmış mobil IS genetik fragmentlerin analizine dayalı olması, spoligotipleme metodunun *M.tuberculosis*'in genomunun yaklaşık %0,1 gibi düşük kısmını oluşturan tek bir lokusu hedeflemesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, spoligotipleme, düşük IS6110 kopya sayılarına ($\text{bant} \leq 5$) sahip *M. tuberculosis* suşlarının ayırt edilmesi için etkin bir şekilde kullanılabilir [54, 113]. Spoligotipleme metodunun epidemiyolojik çalışmalar için tek başına kullanılması durumunda yeterince verimli olmayabilir. Epidemiyolojik çalışmalarda daha iyi ve güvenilir sonuçların elde edilmesi için diğer moleküler yöntemlerle (RFLP, MIRU-VNTR vb.) kullanılması önerilmektedir.(152,159,160)

3.8.4.3. MIRU-VNTR

M.tuberculosis, ökaryot ökartot genomlarında tanımlanmış olan minisatellit lokuslarına benzeyen ardışık tekrarlayan dizilerin tanımlanmış olduğu ilk bakteri gruplarından biridir. Mikobakteriyel ardışık tekrarlayan diziler, insan ve hayvanladakine benzer olup değişken sayıda ardışık tekrar lokusları(Variable Numbers of Tandem Repeats =VNTRs) olarak adlandırılmışlardır. Mikobakterilerde tanımlanmış olan sıralı tekrar (tandem repeat) dizileri: major polymorphic tandem repeat (MPTR) lokusları ve exact tandem repeat (ETR) lokusları olmak üzere İki tiptir. Frothingham and Meeker- O'Connell *M. tuberculosis* complex suşlarında VNTR lokuslarının ilk sistematik analizlerini gerçekleştirdiklerinde, uzunlukları 53-76 bp arasında değişen beş(A-E) major polimorfik sıralı tekrar (major polymorphic tandem repeat =MPTR) ve altı(A-F) tam sıralı tekrarından (exact tandem repeats=ETR) oluşan 11 lokus buldular⁽¹⁶¹⁾. *M. tuberculosis* genomunda özgün 41 farklı değişebilen sıralı tekrarlar (variable tandem repeats) tanımlanmış ve bu farklı sıralı tekrarlara mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) adı verilmiştir. İlk zamanlarda MTBK üyelerinin tiplendirilmesinde bunlardan 12'si kullanılmış

daha sonra yöntemin ayırım gücünü arttırmak için analiz edilen lokus sayısı 15'e çıkarılmıştır. MIRU-VNTR analizinin ayırt edici gücü tipik olarak değerlendirilen lokus sayısı ile orantılı olduğundan son olarak *M.tuberculosis* suşlarının genotiplendirilmesi için yeteri düzeyde polimorfizm gösterdikleri tespit edilen 24'e çıkarılarak günümüzde kullanılan MIRU-VNTR standart yöntemi geliştirilmiştir (16,162).

Yeni bir PCR tabanlı tiplendirme medu olan bu yöntem, intergenik bölgedeki değişken sayıda tekrar dizileri (VNTR) içeren çoklu genomik lokusların analizine dayanır. Tekrarlama birimi boyutları yaklaşık 50 ila 110 bp arasında değişir. VNTR lokuslarının polimorfizmine dayalı bu genotiplendirme metodu, her VNTR lokusunu içine alan yan bölgelere özgü primerler kullanılarak, hedef bölgelerin PCR aracılığıyla amplifiye edilmesi ve bu PCR ürünlerinin standart jel elektroforezi yardımıyla görselleştirilmesine dayanır. amplifiye edilen hedef bölgelerin bant büyüklüklerinden hareketle lokuslardaki tekrarlayan dizi sayısı ile lokusu içine alan her iki yandaki yerleşmiş genom segmentlerinin boyutu tespit edilebilir (Şekil 12).



Şekil 12. *M.tuberculosis*'in VNTR tiplendirme prensibi(163)

Yeni bir PCR tabanlı tiplendirme medu olan MIRU-VNTR pratik olması, maliyet etkin olması, tekrarlanabilir sonuçlar ve yüksek ayırım gücüne sahip olması bu yöntemin *M.tuberculosis* suşlarının genotiplendirilmesi için uygun bir yöntem haline getirmiştir.

3.8.4.5. SNP analizi

M.tuberculosis'in kapsamlı karşılaştırmalı genomik analizi, MTBK üyelerinin kromozomları arasında dikkate değer bir DNA dizi korunumu(%99) ortaya koyduğundan, nükleotit seviyesindeki polimorfizmler, bu alanda çalışan araştırmacılara klinik izolatları ayırt etmek ve klinik suşların filogenetik ilişkilerini incelemek için bir moleküler marker oluşturur. Hem nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms (nsSNP) hem de synonymous SNP (sSNP) polymorphism'ler *M.tuberculosis* izolatlarını karşılaştırmada uygulanabilecek faydalı bilgiler sağlar.

Genel olarak nsSNP'ler iç veya dış etkiler sonucu bir amino asit değişikliğine neden olabilir. Bu nedenle ilaç direnciyle ilgili genetik lokuslardaki nsSNP'ler fenotipik ilaç direncine neden olabilir. Buna göre *M.tuberculosis*'in antitüberküloz ajanlara direnci hemen hemen her zaman kromozomların ilgili bölgelerindeki nonsynonymous nokta mutasyonları, insersiyon ve delesyon gibi genetik değişimlerle korelasyon gösterir. Buna karşın işlevsel olarak nötr kabul edilen SNP'ler, fonksiyonel proteinlerin amino asit dizilimlerinin değişimine neden olmazlar. Yapısal veya housekeeping genlerde meydana gelen bu SNP'ler, mikobakteriler arasındaki evrimsel ilişkilerin belirlenmesinde ve genotipik ayırımında moleküler bir temel oluştururlar. Bu yöntemi baz alarak yapılan çalışmalarla, MTBK üyeleri, katalaz-peroksidaz enzimini kodlayan katG genin 463. Kodonundaki (Leu463Arg) ve DNA giraz enziminin A alt ünitesini kodlayan gyrA geninin 95.kodonundaki (Thr95Ser) polimorfizm kombinasyonlarına dayalı olarak üç temel genotipik gruba(principle genetic groups=PGG) ayrılmaktadır. Bu üç temel grup;PGG1 (katG⁴⁶³ CTC [Leu] gyrA⁹⁵ ACC [Thr]), PGG2 (katG⁴⁶³ CGG [Arg] gyrA⁹⁵ ACC [Thr]), ve PGG3 (katG⁴⁶³ CGG [Arg] gyrA⁹⁵ AGC [Ser])'ten oluşmaktadır(20,1). Yapılan bu çalışmalar klinik izolatların filogenetik ilişkisine daha fazla ışık tutarken, aynı zamanda farklı soyların popülasyonlarda farklı epidemiyolojiler gösterip göstermediğini incelemek için geniş bir çerçeve işlevi görür(147).

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Örneklerin Toplanması

Diyarbakır ilimizde bulunan farklı hastane ve verem savaş dispanserlerinden Ocak 2014-Ağustos 2019 tarihleri arasında akciğer tüberkülozu ve/veya şüpheli temas öyküsü ile Dicle Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji birimine farklı klinik ve polikliniklerden gönderilen hastalara ait balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL), apse, açlık mide sıvısı (AMS), BOS, doku ve eklem sıvısının bulunduğu klinik materyallerden sıvı bazlı (MGIT960) ve katı bazlı (Löwenstein Jensen-LJ) besiyerleri kullanılarak izole edilen ve MPT64(BD,Polonya) kart testi ile MTBK üyesi oldukları doğrulanan, 69 MTBK izolatu çalışmaya dahil edildi.

İzolatlar genotipik identifikasyon yönünden spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile eş zamanlı olarak direncin moleküler mekanizması GenoType MTBDR*plus* yöntemi ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar SITVIT2 ve miruvntr-plus veritabanları kullanarak analiz edildi.

4.2. Moleküler Yöntemler için Genomik DNA İzolasyonu

4.2.1. Spoligotipleme ve MIRU-VNTR genotiplendirme yöntemleri için genomik DNA izolasyonu

Spoligotipleme ve MIRU-VNTR genotiplendirme yöntemlerinde kullanmak üzere 69 MTBK izolatının DNA izolasyonu amacı ile MGIT sıvı besiyerinden Mickle tissue disintegrator cihazı kullanılarak mekanik ekstraksiyon aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

- 1. Çalışmaya dahil ettiğimiz örneklerden 500µl mikrosantrifüj tüplerine alındı.
- 2. 95°C’de 20 dk inkübe ederek bakterileri inaktive edildi.
- 3. 15.000xg’de 15 dk santrifüjlendi ve supernatantı atıldı.
- 4. 500µl 1xTE buffer ilave edildi.

- 5. 15.000xg'de 15 dk santrifüjledik ve supernatantı atıldı.
- 6. Tüplere 250µl 1xTE buffer ilave edildi.
- 7. 1xTE buffer aşamasından sonra her bir tüpe 100µl cam boncuk (SIGMA acid washed glass beads) ilave edildi.
- 8. 3 dk Mickle tissue disintegrator cihazında mekanik hücre parçalama işlemine tabi tutuldu.
- 9. 15000xG'de 10 dk santrifüj sonrası supernatantı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- 10. İzole edilen DNA'ları -20°C'de saklandı.

4.2.2. GenoType MTBDRplus genotipik direnç analizi için DNA izolasyonu

Fenotipik yöntemler ile RIF ve/veya INH direncini tespit ettiğimiz izolatlarımıza GenoType MTBDR_{plus} (LPA; Hain Life Sciences, Almanya) DNA Line Probe tekniği ile genotipik direnç analizi yapılarak, dirençten sorumlu mutasyonların varlığı ve mevcut mutasyonların sıklığını belirleme amacı ile DNA izolasyonu üretici firma talimatları doğrultusunda aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

- 1. MGIT960 besiyerinde ürettiğimiz suşlarımızdan 1ml ependorflara alındı.
- 2. 10.000xg de 15 dk santrifüj gerçekleştirdik ve supernatantı atıldı.
- 3. Pellet' in üzerine 100 µl F-LYS karışımı ekledik ve vortekslendi.
- 4. 95°C' de 5 dk inkübe edildi.
- 5. 100µl F-NB eklenildi ve vortekslendi.
- 6. En yüksek devirde 5 dk santrifüj aşamasından sonra süpernatantı yeni bir tüpe aktararak analiz yapılacağı zamana kadar -20°C'de saklandı.

4.3. İzole edilen DNA'ların Spoligotipleme, MIRU-VNTR ve GenoType MTBDRplus ile Analizleri

4.3.1. Spoligotipleme

İzolatların genotiplerini ve klonal ilişkilerini belirleme amacı ile DR bölgesini hedef alan biotin işaretli primerler kullanarak spoligotipleme yöntemi uygulandı.

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

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

Her çalışmamızda pozitif kontrol (*M. bovis* ve *M. tuberculosis* H37Rv) ve negatif kontrol (dH₂O) kullanıldı.

Her bir izolat için reaksiyon karışımı, 17.5µl dH₂O, 25µl 2x PCR Master Mix, 1.25µl DRA (5pmol/µl), 1.25µl DRb (5pmol/µl), 5µl Kalıp DNA, hazırlandı ve Thermal Cycler gerleştirildi. Amplifikasyon aşamalarını ön denatürasyon 96°C 5 dk; 30 siklus olmak üzere denatürasyon 96°C 1 dk, annealing 55°C 1 dk, uzama 72°C 30 sn: son uzama 72°C 5 dk olarak ayarlandı.

PCR sonrası ampikonların literatürlerde belirtilen şekilde membran hibridizasyonu gerçekleştirildi ve hibridizasyon sonrası ürünler streptavidin alkalen fosfataz enzimi ve fosfatlı kemifloresan substratı ile görünür hale getirildi.

Spoligotipleme metodu sonuçlarının yorumlanması aşamasında, hibridizasyonu sonucunda membran üzerindeki spacer bölgelerin varlığı ve yokluğunu dikkate alınarak değerlendirildi.

Elde ettiğimiz sonuçları Oktal kodlama yöntemi kullanılarak 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan “Oktal kod” formatına çevirerek, aşağıda belirtilen veritabanlarını kullanarak izolatlarımızın kümeleri ve familyaları (clade) belirlendi.

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

- <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>
- <http://www.miru-vntrplus.org>

4.3.2. MIRU-VNTR

- Çalışmada 15 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanıldı. Hedeflenen MIRU lokusları için literatürde belirtilen primer çiftler sentezletildi ve her bir suşta özgü MIRU lokusunun VNTR sayısının belirlenmesinde PCR yöntemi kullanıldı.

4.3.2.1. PCR primer dizileri ve amplifikasyon aşamaları

- PCR amplifikasyonu ve analiz aşamalarında, hedeflenen MIRU lokusları için kullanılan primerler Tablo 2’de verilmiş olup, her bir izolata özgü 15 lokusun VNTR sayısının belirlenmesi amacı ile PCR amplifikasyonu için kullanılacak malzemeler ve miktarları Tablo 3’de VNTR bölgelerine spesifik amplifikasyon aşamaları Tablo 4’te belirtilen protokole göre gerçekleştirildi. Amplikonlar 120V, 45 dk, etidyum bromürlü % 2 lik agaroz (SIGMA) jel elektroforezinde yürütüldü. Beklenen bantların uzunluğuna bağlı olarak, her bir MIRU lokusunda bulunan allel tekrar sayıları Tablo 5’teki PCR bant büyüklüklerine dayanarak belirlendi.

Tablo 2. 15 lokus MIRU-VNTR yönteminde kullanılan primerler

Primerler	Tekrar bölgeleri bp	Primer dizileri
MIRU 4; ETRD	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGCCAGC
MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG
MIRU 40	54	GGGTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
MIRU 10	53	GTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
MIRU 31; ETRE	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT
Mtub04	51	CTTGCCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC
ETR C	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
Mtub30	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
Mtub39	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
QUB-4156	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT
QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT
Mtub21	57	AGATCCCAAGTTGTCGTCGTC CAACATCGCCTGGTCTGTGA
QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTCCCGAT

Tablo 3. MIRU-VNTR PCR aşamasında kullanılan malzemeler ve miktarları

PCR Amplifikasyon bileşenleri	Hacim
dH ₂ O*	µl
2X PCR Master Mix (Thermo science)	12,5 µl
DMSO	1 µl
Primer Çifti	1,5 - 3 µl
DNA	5 µl
Toplam hacim	25 µl

* Seçilen primer miktarına göre toplam hacim dH₂O ile ayarlandı.

Tablo 4. VNTR bölgelerine spesifik Amplifikasyon aşamaları

Amplifikasyon Aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	35
Bağlanma*	61°C	30 sn	
Uzama**	70°C	1 dk	
Son Uzama	72 °C	7 dk	1

* Mtub 04, Mtub 39, QUB primerleri için bağlanma basamağı 55°C’de 30sn

**QUB 26 primeri için uzama basamağı 70°C’de 1 dk 30sn

Tablo 5. MIRU-VNTR yönteminde kopya sayılarına göre PCR ürünü bant büyüklükleri

Primerler	0 Kopya	1 Kopya	2 Kopya	3 Kopya	4 Kopya	5 Kopya	6 Kopya	7 Kopya	8 Kopya	9 Kopya	10 Kopya
ETRA	-	247	322	397	472	547	622	697	772	847	922
ETRC	-	172	230	288	346	404	462	520	578	636	684
MIRU04-ETRD	-	253	330	407	484	561	638	715	792	869	-
MIRU10	-	535	590	643	696	749	802	855	908	961	1013
MIRU16	-	618	671	724	777	829	882	935	988	1041	-
MIRU26	-	511	562	613	664	715	766	817	868	919	-
MIRU31-ETRE	-	545	598	651	704	757	810	863	916	-	-
MIRU40	-	407	461	55	569	623	677	731	785	839	893
Mtub04	177	218	269	320	371	422	473	524	575	626	-
Mtub21	-	149	206	263	320	377	434	491	548	605	662
Mtub30	-	261	319	377	435	493	551	609	667	725	783
Mtub39	225	283	341	399	457	515	573	631	689	747	-
Qub11b	-	136	205	274	343	412	481	550	619	688	757
Qub26	-	264	375	486	597	708	819	930	1041	1152	1263
Qub4156	563	622	681	740	799	858	917	-	-	-	-

4.3.3. GenoType MTBDRplus genotipik direnç analizi

Üretici firmanın (LPA; Hain Life Sciences, Almanya) talimatları doğrultusunda DNA izolasyonunu takiben PCR işlemi için, kit içeriğinde bulunan biotin ile işaretli primerleri içeren AM-A ve AM-B amplifikasyon karışımlarından sırası ile 10µl ve 35µl olacak şekilde toplam çalışacağımız örnek sayısına göre hazırlandı ve tüplere dağıtıldı. Toplam hacim 50µl olacak şekilde karışımlarımıza 5µl DNA ekledik ve Thermal Cycler’da Tablo 6.’da belirtilen amplifikasyon aşamalarını kullanarak reaksiyonumuz gerçekleştirildi. PCR işlemi sonrasında ampliconların striplere hibridizasyonunu manuel olarak üretici firma talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, Hain Lifescience GenoType MTBDRplus direnç analizi ve mutasyon araştırma cetveli ile karşılaştırarak yorumlandı.

Tablo 6. GenoType MTBDRplus Amplifikasyon aşamaları

Amplifikasyon Aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	15 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	65°C	2 dk	10
Denatürasyon	95°C	25 sn	
Bağlanma	50°C	40 sn	20
Uzama	70°C	40 sn	
Son Uzama	70 °C	8 dk	1

5. BULGULAR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikobakteriyoloji Laboratuvarımıza gönderilen hastalarına ait klinik materyallerden izole edilen primer anti-tüberküloz ilaçlara dirençliliğini fenotipik olarak sıvı bazlı MGIT960 yöntemi ile belirlediğimiz, 32 (%46.4) suş ÇİD-TB iken geri kalan suşlardan üç tanesi (%4.3) RIF, 34 (%49.3)'ü de INH ile birlikte primer seçenek anti-tüberküloz ajanlardan bir veya bir kaçına dirençli toplam 69 MTBK izolatını, spoligotipleme ve 15 lokus MIRU-VNTR yöntemleri ile genotipik çeşitlilik ve klonal ilişkiler yönünden değerlendirildi.

Çalışılan 69 MTBK izolatın 65'inde (%94.2) genotipik identifikasyon yönünden yorumlanabilir sonuçlar alındı. Batman, Diyarbakır ve Elazığ illerine ait 2 MDR ve 2 INH dirençli toplam 4 izolat düşük DNA konsantrasyonu ve/veya aşırı DNA kirliliğinden kaynaklanan sebeplerden dolayı çalışma dışı bırakıldı.

Suşların izole edildiği hastaların ikamet adresleri Tablo 7'de verilmiştir. Hastaların ikamet adreslerine göre demografik özellikleri incelendiğinde, hastaların en çok Diyarbakır(%53.8) ilinde yoğunlaştığını buna karşılık en düşük hasta sayılarının birer vaka ile İstanbul (%1.5) ve Ukrayna (%1.5) kökenli olduğu görüldü.

Tablo 7. Hastalara ait izolatların ikamet adreslerine göre dağılımları

İkamet Adresleri	Örnek Sayısı	
	n	%
Diyarbakır	35	53.8
Mardin	9	13.8
Şanlıurfa	7	10.8
Bingöl	4	6.2
Suriye	4	6.2
Bitlis	2	3.1
Siirt	2	3.1
İstanbul	1	1.5
Ukrayna	1	1.5
Toplam	65	100

Fenotipik tanımlamadan sonra moleküler çalışmalara uygun kalitede DNA ekstrakte edilerek çalışmaya dahil edilen izolatların, MGIT960 fenotipik duyarlılık testi sonucunda; STR ve INH dirençli 18 (%27.7), mono-INH dirençli 14 (%21.5) olmak üzere toplam 32 (%49.2) izolatın INH dirençli (INH-R), MDR direnç patern tanımına göre değerlendirdiğimizde bütün anti tüberküloz ilaçlara dirençli 21 (%32.3), INH ve RIF dirençli 4 (%6.2), STR, INH ve RIF dirençli 3 (%4.6) ve INH, RIF ve EMB dirençli 2 (%3.1) olmak üzere toplam 30 (%46.2) izolatımızın MDR direnç paterni ile uyumlu olduğunu, mono-RIF direncinin (monoRIF-R) 3 (%4.6) hasta izolatında görüldüğü tespit edildi (Tablo 8).

Tablo 8. Hastalara ait izolatların direnç profillerine göre dağılımları

Direnç Profili	Örnek Sayısı	
	n	%
ÇİD*	30	46.2
mono RIF-D**	3	4.6
mono INH-D***	14	21.5
RIF-D +diğer	0	0
INH-D +diğer	18	27.7
Toplam	65	100

*ÇİD: Çoklu ilaç dirençli, **RIF-D: Rifampicin dirençli, ***INH-D: Isoniazid dirençli

Sonuç olarak test izolatlarımızın %50.8 (33/65)'i RIF dirençli iken %95.4 (62/65)'ünün INH dirençli olduğu görüldü.

Çalışılan izolatların direnç profillerinin hastaların ikamet adreslerine göre dağılımları incelendiğinde; Bingöl, Bitlis, İstanbul ve Ukrayna kökenli hastalara ait izolatların tamamının ÇİD-TB suşlarından oluştuğu, Siirt ili kökenli hastalara ait izolatların tamamının ise INH-R olduğunu, yani diğer duyarlılık profillerinden daha yüksek oranda çoklu ilaç direnci geliştirme riskine sahip oldukları tespit edildi. İzolatların direnç profillerinin hasta ikametlerine göre dağılımları Tablo 9'de verilmiştir.

Tablo 9. İzolatların direnç profillerinin hasta ikametlerine göre dağılımları

İkamet Adresleri / Direnç Profili	ÇİD		INH-D		RIF-D		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Diyarbakır	15	42.9	17	48.6	3	8.6	35	100
Mardin	4	44.4	5	55.6	-	-	9	100
Şanlıurfa	1	14.3	6	85.7	-	-	7	100
Bingöl	4	100	-	-	-	-	4	100
Suriye	2	50	2	50	-	-	4	100
Bitlis	2	100	-	-	-	-	2	100
Siirt	-	-	2	100	-	-	2	100
İstanbul	1	100	-	-	-	-	1	100
Ukrayna	1	100	-	-	-	-	1	100
Toplam	30	46.2	32	49.2	3	4.6	65	100

* ÇİD: Çoklu ilaç dirençli, ** RIF-D: Rifampicin dirençli, *** INH-D: Isoniazid dirençli

Dirençli izolatların izole edildikleri hasta cinsiyete ve suşların izole edildiği yıllara göre dağılımı Tablo 10'da verilmiştir. İlaç direncinin erkek hastalarda %75.4 (49/65) oranı ile daha fazla görüldüğü tespit edildi.

Tablo 10. İzolatlarımızın izole edildikleri hasta cinsiyetleri ve yıllara göre dağılımları

		KADIN (n=16)							ERKEK (n=49)					Toplam	
Yıl/	ÇİD	INH-D		RIF-D				ÇİD	INH-D		RIF-D				
Direnç Profili	n	%	n	%	n	n	%	%	n	%	n	%	n	%	
2014	3	42.9	-	-	-	-	4	57.1	-	-	-	-	7	100	
2015	2	15.4	4	30.8	-	-	-	-	7	53.8	-	-	13	100	
2016	1	9.1	-	-	1	9.1	8	72.7	-	-	1	9.1	11	100	
2017	-	-	1	6.2	-	-	5	31.3	9	56.3	1	6.2	16	100	
2018	1	11.1	2	22.2	-	-	3	33.3	3	33.3	-	-	9	100	
2019	1	11.1	-	-	-	-	2	22.2	6	66.7	-	-	9	100	
Toplam	8	12.3	7	10.8	1	1.5	22	33.8	25	38.5	2	3.1	65	100	

*ÇİD: Çoklu ilaç dirençli, **RIF-D: Rifampicin dirençli, ***INH-D: Isoniazid dirençli

ÇİD, INH-D ve RIF-D izolatların yayma pozitif ve negatif sonuçlarının yıllara göre dağılımı dirençli suşlarımızın izole edildikleri klinik materyellerin direkt yayma

sonuçlarının yıllara göre dağılımı Tablo 11’de verilmiştir. Yayma pozitifliği dirençli suşlar arasında %64.6 (42/65) ile daha yüksek oranda görüldüğü tespit edildi.

Tablo 11. Dirençli izolatların yayma sonuçlarının yıllara göre dağılımları

Yıl/ Direnç Profili	Yayma Pozitif (n=42)							Yayma Negatif (n=23)						Toplam	
	ÇİD		INH-D		RIF-D			ÇİD		INH-D		RIF-D		n	%
	n	%	n	%	n	n		n	%	n	%	n	%		
2014	6	85.7	-	-	-	-	1	14.3	-	-	-	-	-	7	100
2015	2	15.3	5	38.5	-	-	-	-	6	46.2	-	-	-	13	100
2016	6	54.5	-	-	2	18.2	3	27.3	-	-	-	-	-	11	100
2017	4	25	6	37.4	1	6.3	1	6.3	4	25	-	-	-	16	100
2018	2	22.2	4	44.4	-	-	2	22.2	1	11.2	-	-	-	9	100
2019	2	22.2	2	22.2	-	-	1	11.2	4	44.4	-	-	-	9	100
Toplam	22	33.8	17	26.2	3	4.6	8	12.3	15	23.1	-	-	-	65	100

*ÇİD: Çoklu ilaç dirençli, **RIF-D: Rifampicin dirençli, ***INH-D: Isoniazid dirençli

Fenotipik yöntemler ile 30 ÇİD ve 3 monoRIF dirençli toplam 33 izolatın direncin moleküler direnç mekanizması, hibridizasyon temelli Hain Lifescience GenoType MTBDR_{plus} yöntemi ile değerlendirildi. Fenotipik ve genotipik direnç profili sonuçları karşılaştırıldığında; analiz edilen izolatların rifampisin ve isoniyazid için sırası ile 31/33 ve 26/30 suşta fenotipik direncin bilinen bir moleküler direnç mekanizması ile izah edilebileceği belirlendi. Dirençli suşlardan 19 (%57.6) izolatta RIF direncinden *rpoB* genin 531. gen bölgesinde TCG/TTG mutasyonunun, INH direncinde ise 14 (%46.7) izolatta *katG*315 gen bölgesindeki AGC/ACC mutasyonunun, 8 (%26.7) izolatta da *inhA* gen bölgesinin -15 pozisyonunda C/T mutasyonlarının dirençten sorumlu yaygın mutasyonlar olduğu görüldü. Dirençli izolatların sayısı ve yüzdeleri tablo Tablo 12’de verildi.

Tablo 12. Dirençli izolatlar a ait moleküler direnç mekanizmaları ve dağılımları

Gene	Kodon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	İzolat sayısı	
				n	%
<i>rpoB</i>	516	GAC/GTC	Asp 516 Val	3	%9.1
	526	CAC/GAC	His 526 Asp	5	%15.2
	526	CAC/TAC	His 526 Tyr	1	%3
	531	TCG/TTG	Ser 531 Leu	19	%57.6
	Diğer			5	%15.2
<i>katG</i>	315	AGC/ACC	Ser 315 Thr	14	%46.7
	315	AGC/AAC	Ser 315 Asn	4	%13.3
	Diğer			3	%10
<i>inhA</i>	-15	C/T	C15T	8	%26.7
	- 8	T/A	T8A	2	%6.7
	Diğer			1	%3.3

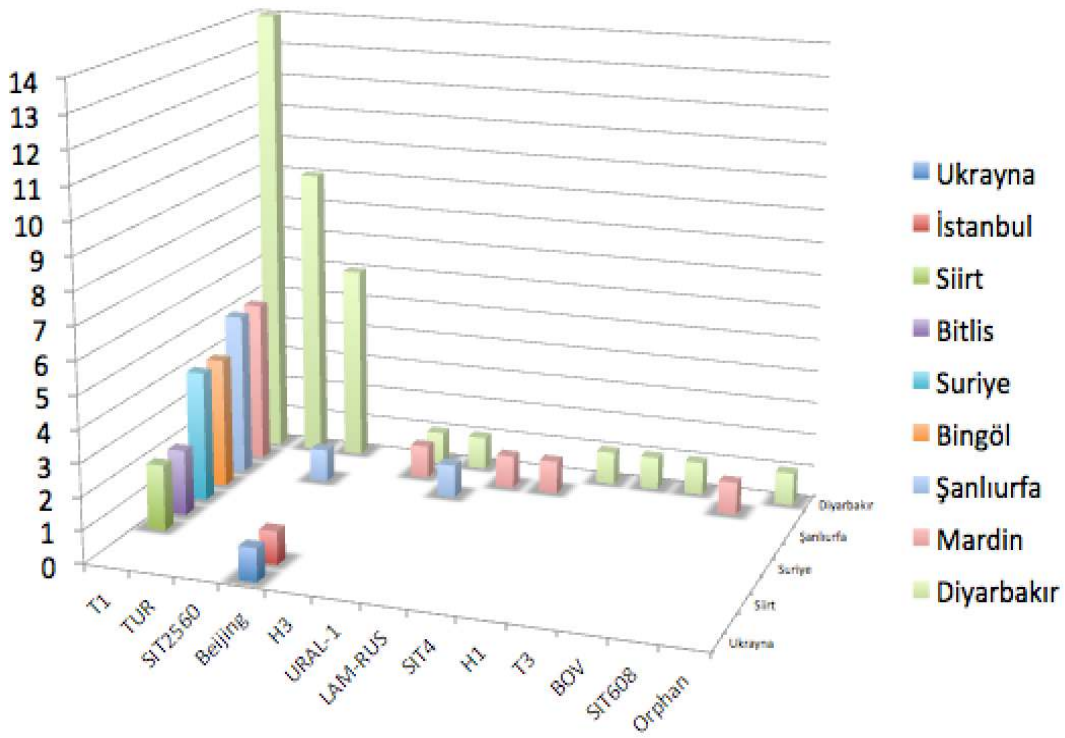
Toplam 65 MTBK izolatın genotipik özelliklerini moleküler epidemiyolojik yöntemlerden biri olan spoligotipleme metodu ile analiz ettiğimizde; suşların 19 farklı spoligotip paternine dağıldıkları görüldü. İzolatların 53'ünün 7 farklı spoligotipinde kümelenirken 12 izolatın tek üyeli unique profiller oluşturdukları tespit edildi. Spoligotipleme verilerine göre en çok üyeye sahip ailelerin 36 (%55.4) üyeli T1 ve 9 (%13.8) üyeli TUR aileleri olduğu görüldü. Suşlar arasında en yaygın spoligotiplerin ise 24 (%36,92) izolat ile T1 ailesi içerisinde yer alan SIT53 ve 8 (%12,31) izolat ile TUR ailesi içerisinde yer alan SIT41 olduğu belirlendi. Tablo 13'de izolatların spoligotip profil ve genotip dağılımının sayı ve yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 13. İzolatların spoligotip profil ve genotip dağılımları

Spoligotip Profilleri	SIT	Lineage	Sayı	%
v o o o o v v v v v v	53	T1	24	36,92
v v v v v v v v v v v v v v v v v o o o o v v o o v v v v v v o o o o v v v v v v	41	TUR	8	12,31
v v v v v v v v v v o v v v v v v o o o o o o o o v v o o o o o o o o o v v v v v	2560		7	10,77
o o o o v v v v v v v o o v v v v v v v v v v v v v v v v v o o o o v v v v v v	284	T1	6	9,23
o v o o o o v v v v v v	7	T1	4	6,15
v o o o v v o o o o v v v v v v	777	URAL-1	2	3,08
o v v v v v v v v v	1	Beijing	2	3,08
o v v v v v v v v v v v v o o o o v v v v v v	2558	T1	1	1,54
v o v v v v v v v o o o o v v v v v v	122	T1	1	1,54
v o o o v v o v o o o o v v v v v v	1735	H3	1	1,54
v o v o o o o v v v v v v	50	H3	1	1,54
v o o o o v v o o v v v v o v v v	1261	TUR	1	1,54
o v v v v v v v v v v o v v v v v v v v v v v v v v v v v v o o o o v v v v v v	1834	T3	1	1,54
v v	254	LAM-RUS	1	1,54
v o o o o o o v v o o o o v v v o v v	62	H1	1	1,54
v v o v v v v v o v o o o o o	820	BOV	1	1,54
o v v v v v v v v v o o o o v v v v v v	4		1	1,54
v v v v v v v v o o o v v v v v v v v v v v v v v o o o o o o o o o o o o o o o o o	608		1	1,54
v v v v v v v v v v o v o v v v v v v o o o o o o o o v v o o o o o o o o o v v v v v	orphan		1	1,54
ToPlam			65	100,00

En çok izolat içeren T1 ailesi üyelerinin, İstanbul ve Ukrayna kökenli hastalara ait izolatlar hariç, diğer bütün illerde görüldüğünü ve bütün il izolatları arasında en sık tanımlanan aile olduğunu tespit edildi.

Dirençli izolatlarımız arasında ikinci en yaygın aile olan TUR ailesinin, yalnızca Diyarbakır kökenli hastalara ait toplam 9 (%13.8) üyeden oluştuğu belirlendi. Bir başka ifade ile TUR ailesi içinde tanımlanan suşların tamamının Diyarbakır'lı hasta izolatlarına ait olduğu görüldü. Şekil 13'de Spoligotip ailelerinin izole edildiği hasta ikamet adreslerine göre dağılımları verilmiştir.



Şekil 13. Spoligotip ailelerinin ikamet adreslerine göre Dağılımları

Fenotipik olarak RIF ve/veya INH dirençli izolatları dahil ettiğimiz ve suşlarımızın spoligotiplerinin direnç profilleri ile muhtemel ilişkisini tespit amacı ile yaptığımız değerlendirmede; ÇİD-TB olarak tanımladığımız suşlardan 20 (%55.6) izolat T1 ailesinde, bu orana benzer olarak INH-D direnç profiline sahip 16 (%44.4) izolatın da aynı ailede yoğunlaştıkları görüldü. Aynı zamanda birer izolat içeren LAM-RUS, SIT4 ve SIT608 ailelerine ek olarak, çalışmamızda veritabanlarında yer almayan orphan spoligopaternalinin de yalnızca INH dirençli suşlar arasında idi.

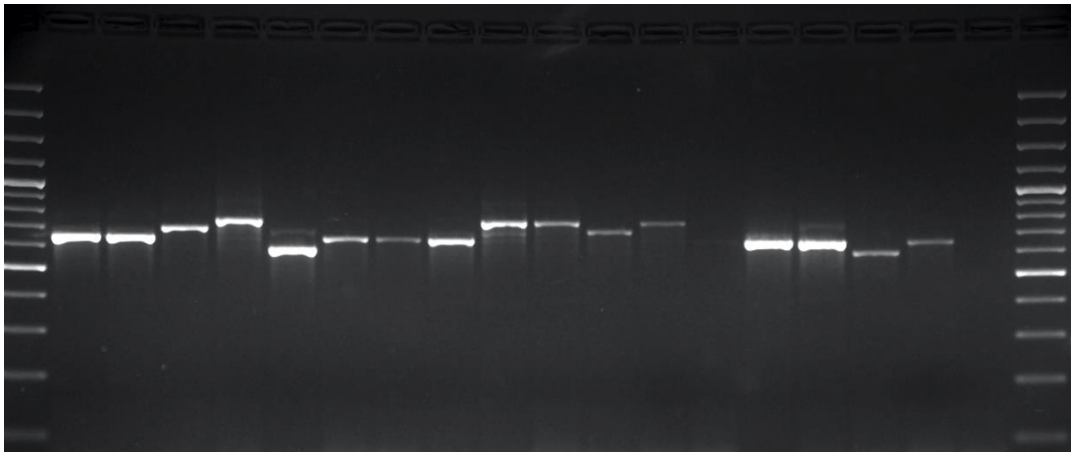
Buna karşılık olarak rifampisin dirençli 3 (%4.6) izolatın birer üye ile H1, T3 ve BOV ailelerine dağıldığı belirlendi. Tablo 14’de Spoligotip ailelerinin direnç profillerine göre dağılımları verilmiştir.

Dünya genelinde yayılım gösteren yaygın ilaç dirençli tüberküloz tanımına uyan, toplam 2 (%3.1) Beijing suşun, biri İstanbul diğeri de Ukrayna’da ikamet eden iki farklı hastaya ait klinik materyallerden izole edilen MDR suşlarımız arasında yer aldığı tespit edildi. Yine çoklu direnç profiline sahip ve diğer direnç profillerinde görülmeyen URAL-1 ailesine ait toplam 2 (%3.1) izolatın, Diyarbakır ve Şanlıurfa kökenli hasta örneklerinden izole edilen suşlar arasında olduğu görüldü.

Tablo 14. Spoligotip ailelerinin direnç profillerine göre dağılımları

Spoligotip / Direnç Profili	ÇİD		INH-D		RIF-D		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
T1	20	55.6	16	44.4	-	-	36	100
TUR	3	33.3	6	66.7	-	-	9	100
SIT2560	2	28.6	5	71.4	-	-	7	100
Beijing	2	100	-	-	-	-	2	100
H3	1	50	1	50	-	-	2	100
URAL-1	2	100	-	-	-	-	2	100
LAM-RUS	-	-	1	100	-	-	1	100
SIT4	-	-	1	100	-	-	1	100
H1	-	-	-	-	1	100	1	100
T3	-	-	-	-	1	100	1	100
BOV	-	-	-	-	1	100	1	100
SIT608	-	-	1	100	-	-	1	100
Orphan	-	-	1	100	-	-	1	100
Toplam	30	46.2	32	49.2	3	4.6	65	100

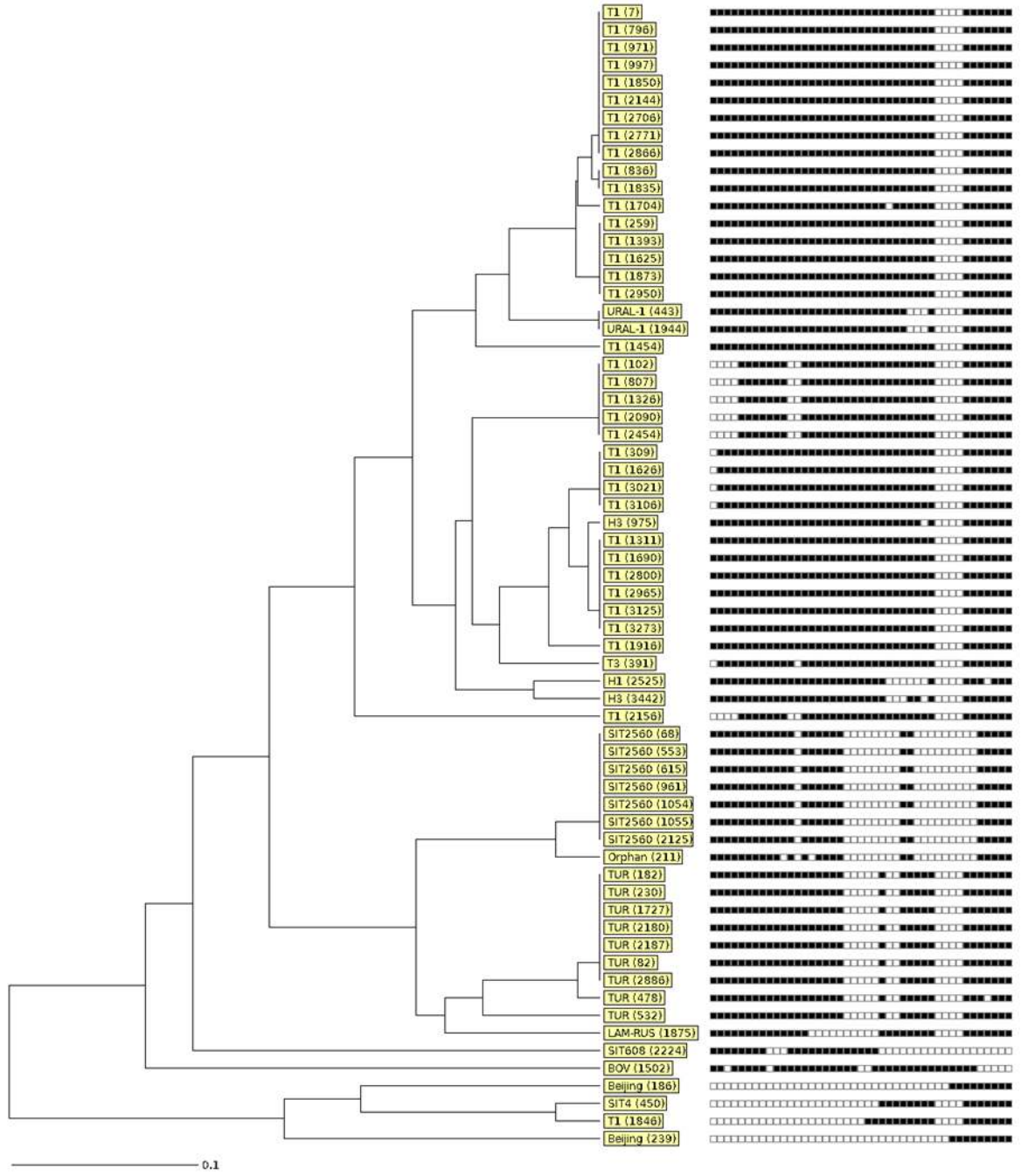
*ÇİD: Çoklu ilaç dirençli, **RIF-D: Rifampicin dirençli, ***INH-D: Isoniazid dirençli



Şekil 14. MIRU-VNTR PCR jel görüntüsü

Spoligotiplleme metodu ile ailelere dağılan suşlar arasındaki klonal ilişkiyi göstererek ayırım gücü daha yüksek sonuçlar üretmek amacı ile çalıştığımız 15 lokus MIRU-VNTR sonuçlarını değerlendirdiğimizde, çalışmaya dahil edilen 65 izolatın, 47’sinin 9 küme de yoğunlaştığı ve 18’inin de tek üyeli olmak üzere toplam 27 farklı kümeye dağıldıkları görüldü şekil 14’te MIRU-VNTR PCR jel görüntüsü verilmiştir. MIRU-VNTRplus (<https://www.miru-vntrplus.org>) veritabanını kullanarak tespit edilen MIRU-VNTR paternleri ile birlikte spoligo-ailelerinden filogenetik ağaç luşturuldu (şekil 15).

Filogenetik ağağtan faydalanarak izolatlarımızın demografik ve coğrafik karakteristiklerini filogenetik özellikleri ile tekrar değerlendirildi. Birden çok üyeli kümelerin genellikle farklı illerden gelen hastalara ait karışık izolatlardan luştuğu tespit edildi. MIRU-VNTR yönteminin her ne kadar ayırım gücü spoligotiplleme yönteminden yüksek de olsa, çalışmamıza dahil ettiğimiz izolatlarımızın 15 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile analizi sonucunda istatistiki anlamda klonal ilişki için bir veri bulunamadı.



Şekil 15. İzolatların filogenetik ağaç ile ilişkilendirilmesi

6. TARTIŞMA

Bir yoksulluk hastalığı prototipi olan tüberküloz, tedavi edilebilir ve önlenabilir bir enfeksiyon hastalığı olmasına rağmen, günümüzde önemli bir küresel sağlık sorunu ve insanlığı etkileyen en önemli bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. Günümüzde her yıl küresel çapta bir milyondan fazla insanın ölümüne neden olan tüberküloz, küresel düzeydeki gelir adaletsizliğinin bir sonucu olarak ortaya çıkan yetersiz beslenme, yoksulluk, iç karışıklıklar gibi sosyoekonomik sorunların olduğu düşük ve orta gelirli ülkelerde yaygın olarak görülmektedir. Bununla birlikte yüksek gelirli ülkelerde bağışıklık sistemini zayıflatan HIV/AIDS vakaları, diyabet, kronik rahatsızlıklar gibi TB gelişimine zemin hazırlayan durumların insidansındaki artış, tüberkülozun bu ülkelerde de halk sağlığı için bir tehdit haline gelmesine neden olmuştur. Anti tüberküloz ilaçların keşfedilmesi ve tedavide kullanılmaya başlanmasıyla tüberküloza karşı verilen mücadelede önemli kazanımlar elde edilmiştir. Ancak seksenlerin başlarında ortaya çıkan ve yaygınlaşan HIV/AIDS vakaları ile birlikte son yıllarda ÇİD/YİD-TB vakalarındaki artış ile son yıllardaki Covid-19 pandemisi, temel tüberküloz hizmetlerinin sağlanmasında ve küresel tüberküloz yükünün azaltılmasında yıllarca kaydedilen ilerlemeyi tersine çevirmiş durumdadır(3). Bu durum uygulanan tüberküloz kontrol programlarının gözden geçirilmesini ve tüberkülozun tanısı, tedavisi ve önlenmesine olanak sağlayacak özgül, duyarlı, hızlı ve maliyet-etkin modern araç ve yöntemlerin geliştirilmesini gerekli kılmıştır.

DSÖ verilerine göre; 2020 yılında dünya çapında 10 milyona yakın yeni tüberküloz vakasının görüldüğü ve TB nedeniyle 1,3 milyonu HIV negatif kişiler arasında, 214 000’inde HIV pozitif kişiler arasında olmak üzere toplamda 1,5 milyondan fazla kişinin ölümüne neden olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca 2020’de yaklaşık 350-400 bin yeni ÇİD-TB veya RD-TB vakasının tespit edildiği ve bunların küresel düzeyde yıllık ilaca dirençli vakaların %40’nı oluşturduğu tahmin edilmektedir(3)

MTBK üyelerinden özellikle de çoklu ilaca direnç gösteren izolatların yayılmasının engellenmesi, bu suşların tür tanımlanmalarının yapılmasını, ilaç direnç

profillerinin belirlenmesini ve farklı hastalardan elde edilen klinik izolatlar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesini gerektirmektedir. Bu nedenle çoklu ilaca dirençli klinik izolatların taşınma zincirlerinin takip edilmesinde, evrimsel ilişkilerinin belirlenmesinde, direnç gelişimine zemin hazırlayan risk faktörlerinin belirlenmesinde ve epidemiyolojik verilerin elde edilmesinde moleküler yöntemlerin kullanılması, tüberkülozun epidemiyolojisinin belirlenmesi amacına hizmet ettiği gibi DSÖ'nün küresel düzeyde TB eradikasyonu için uyguladığı programların başarıya ulaşmasına olanak sağlayacaktır.

Günümüzde MTBK'nın moleküler epidemiyolojik çalışmalarında bakteri DNA'sında bulunan IS6110 gibi insersiyon dizilerinin kopyalarının tanımlanmasında kullanılan IS6110 RFLP yöntemi, düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) analizine dayanan spoligotiplendirme yöntemi ve intergenik bölgedeki değişken sayıda tekrar dizileri(VNTR) içeren çoklu genomik lokusların analizine dayanan MIRU-VNTR yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Spoligotiplendirme ile MIRU-VNTR yöntemlerinin birlikte kullanılması; uygulama ve standardizasyonlarının kolay olması ile karşılaştırma yapmak için uluslararası veri tabanlarının bulunması nedeniyle klinik izolatların filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde uzun yıllardır altın standart yöntem olarak kullanılan IS6110-RFLP yönteminin yerini almaya başlamışlardır(164,156).

Günümüzde, tüm genom(WGS) analizlerine dayanarak, İnsan tüberkülozunun etiyolojik ajanı olan MTBK üyelerinin, filogenetik olarak farklı yedi soy(Lineage1-7)'dan oluştuğu bilinmektedir. Yapılan birçok çalışma, bu soyların farklı coğrafik bölgelerle ilişkili, güçlü bir filoğrafik popülasyon yapısı gösterdiğini ve ayrıca bu soylardan bazılarının diğerlerinden küresel olarak daha yaygın olduğu ortaya konulmuştur(165). Bu soylardan soy2(L2=East Asian) ve 4(L4=Euro-American) küresel olarak en yaygın bulunan soylardır. Beijing familyasını içeren ve Doğu Asya soyu olarak bilinen soy2, Doğu Asya'da baskın soy olsa da, Orta Asya, Rusya ve Güney Afrikada da yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Avro-Amerikan soyu olarak da bilinen soy4(L4), Asya, Avrupa, Afrika ve Amerika'daki toplumlarda sıklıkla görülmektedir. Soy1(L1=Indo-Oceanic) ve 3(L3=East African-Indian), Doğu Afrika, Orta, Güney ve Güneydoğu Asya ile daha sınırlı bir coğrafi dağılım göstermektedir. Soy5,6(West African) ve 7(Ethiopian) coğrafik olarak en kısıtlı soylar olup,

Afrikanın belirli bölgelerinde görülmektedirler. Bunlardan Batı Afrika 1 ve Batı Afrika 2 soyu olarak bilinen soy 5 ve 6, neredeyse yalnızca Batı Afrika'da veya bu bölgelerden gelen son göçmenlerde görülür. Soy6(L6) öncelikle Batı Afrika'nın Batı kesiminde görülürken, soy5(L5) daha çok Gine Körfezi'ni çevreleyen bölgelerde baskındır. Benzer şekilde, yakın zamanda keşfedilen soy7(L7), Etiyopya ve dünyanın o bölgesinden gelen göçmenlerle sınırlıdır(165,166,167).

Tüberküloza neden olan genotiplerin küresel dağılımını belirlemek amacıyla yapılan bir meta analiz çalışmasında 27 yıl boyunca 85 ülkeden izole edilen 200 bin MTBK suşunun incelendiği 206 çalışmanın analizi sonucunda, Euro-Amerikan soyu(L4) ve Doğu Asya soyu(L5)'unun en yaygın soylar olduğu ve Batı Afrika soyların(L5-6) coğrafik olarak en az küresel dağılıma sahip oldukları belirlenmiştir(168).

Genotiplendirme metotları ve bunların uygulanması sonucu elde edilen veriler, tüberküloz salgınlarında enfeksiyon kaynağının belirlenmesinde ve yeni popülasyonlarda hızla yayılma olasılığı en yüksek olan MTBK genotiplerini belirlemede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır⁽¹⁶⁹⁾. Ayrıca MTBK genotipleriyle ilgili risk faktörlerini anlamak, daha yüksek tedavi başarısızlığı, nüks, ilaç direnci veya ölüm riski ile ilişkili suşlarla enfekte hastaların erken tanısını gerçekleştirmek amacıyla geliştirilecek moleküler tanı testlerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir(168).

Doğu Akdeniz ülkeleri arasında en yüksek TB insidansına sahip ülkelerden biri olan Irak'ta yapılan iki farklı çalışmada, ülkenin farklı yerlerindeki hastalardan izole edilen 270 *M.tuberculosis* suşunun genotiplendirilmesi sonucunda, izolatların %39,6'sının CAS, %29,6'sın T, %7,4'ünün Manu, %7'sinin Haarlem, %4,1'inin Ural, %3,3'ünün LAM, %0.7'sinin LAM7- TUR, %0.7'sinin X, %0.7'sinin EAI, %0.7'sinin S spoligotip familyalarına ait olduğu ve en çok izolatın kümелendiği spoligotip paternlerin sırasıyla SIT309 (CAS1-Delhi) ve SIT1144 (T1) olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadan iki yıl sonra Irak Ulusal tüberküloz Referans Laboratuvarından elde edilen 134 *M.tuberculosis* izolatın, Spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemiyle genotiplendirilmesi sonucunda, klinik izolatların en çok kümелendiği major spoligotip ailelerin sırasıyla, 56(%41.80) CAS1_Delhi, 36

(%26.8)T1, 8(%5.97)H3, 8(%5.97)MANU2 ve 4 (2.98) LAM7-TUR olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu klinik izolatların en fazla kümelenme oranları,20(%14.9) ile T1 ailesine ait SIT1144'te görülürken bunu sırasıyla 19(%14.2) ile CAS1_Delhi ailesine ait SIT125 ve 12(%12.9) kümelenme oranı ile CAS_Delhi ailesine ait SIT22 spoligotipleme paterni izlemiştir. Bu çalışmalardaki ilgi çekici noktalardan biri Irak'a komşu ülkelerde bulunmayan T1 familyasına ait SIT1144'ün baskın spoligotip olması ve Irak bölgesi ile sınırlı bir filocoğrafik dağılım göstermesidir(170,171).

Bir diğer sınır komşumuz olan İran'ın beş farklı bölgesinde *M.tuberculosis* izolatlarının genotipik analizi ve çoklu ilaç direnci ilişkili genotiplerin belirlenmesi amacıyla 291 klinik izolatın dahil edildiği bir çalışmada, majör spoligotipleme ailelerinin sırasıyla, %34.3 ile Ural, %24 ile CAS, %18.2 ile T, %7.5 ile Manu ve %6.1 ile LAM ailelerinin olduğu ve en çok izolatın toplandığı beş spoligotipleme paterninin %15.8 ile SIT127(Ural), %9.2 ile SIT126(CAS1), %6.1 ile SIT53(T1), %5.4 ile SIT284(T1) ve %4.4 ile SIT25(CAS1) olduğunu bildirmişlerdir(172). Yine aynı ülkede yapılan bir derlemede 8329 izolatın incelendiği 34 farklı yayında irandaki en yaygın *M.tuberculosis* major spoligotip ailelerinin %21.94 ile NEW1, %19.21 ile CAS, %12.95 ile EAI ve %12.16 ile T aileleri olduğu, TUR ailesinin de % 2'den daha az bir oranda bulunduğu bildirilmiştir(173). Ayrıca İran ve komşu ülkelerdeki MTBK suşlarının yaygın spoligo modellerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen ve hasta popülasyonunun İran (n=1,074), Afgan göçmenler(n=668), Pakistanlı(n=926) ve Türkiyeli(n=381) hastalardan oluştuğu bir başka çalışmada, Türk hastalar arasında baskın ailenin 36.5% ile T ailesi olduğu ve aynı şekilde İranlı hastalar arasındaki majör spoligotip ailenin 32.3% oranı ile T ailesi olduğunu, Afgan göçmenler ve Pakistanlı hastalar arasında dominant ailenin CAS ailesi olduğu ve oranın sırasıyla %27.4 , %61.3 arasında olduğunu bildirmiştir. Ayrıca Türkiyeli hastalar arasında CAS ailesine rastlanmazken, ikinci dominant aile % ile LAM ailesi olduğunu bildirmişlerdir, bu çalışmada elde edilen bir diğer bulgu da en çok kümelenme görülen spoligotip paternlerinin sırasıyla ST26, ST53, ST11, ST288, ST52, ST1, ST37, ST47, ST41, ST40, ST284, ST50 ve ST458 olduğudur(174).

Suudi Arabistanın farklı bölgelerinde izole edilmiş toplam 1.505 izolatın dahil edildiği bir çalışma sonucunda, baskın spoligotip ailelerinin sırasıyla 22.5% ile CAS, %19.5 ile T, %13.5 ile EAI, %7.5 ile Haarlem, 7.2% ile LAM, % 4.4 ile Beijing,

%2.7 ile X olduğu ve SIT1887 ile SIT 2671 spoligotip patnlerinin Suudi Arabistan’a özgü olabileceği rapor edilmiştir(175).

Zozio ve ark. Ankara ve Malatya illerinden elde edilen 245 *M.tuberculosis* klinik izolatın spoligotipleme yöntemi ile genotiplendirdikleri bir çalışmada, 206 klinik izolatın 33 spoligotipinde kümelenedikleri ve 39 izolatın tek üyeli özel kümeler(unique) oluşturduklarını bildirmişlerdir. Çoklu ilaca direnç ile ilişkili Beijing familyasına ait suşların tespit edilmediği bu çalışmada en büyük kümelenme oranı sırasıyla LAM7-TUR(%21,0), T1(%16,3) ve Haarlem 3(%5,3) majör spoligotip familyaları içerisinde olduğunu bildirmişlerdir. LAM7-TUR familyası içerisinde en fazla SIT41 (15.8%) altında suşların kümelenildiğini bildirmişlerdir(176).

Karslıgil ve arkadaşları tarafından Gaziantep ilimizde 55 klinik *M.tuberculosis* izolatın spoligotipleme ve PCR-RFLP yöntemiyle genotiplendirilmesi sonucunda 13 farklı spoligotipleme paterni elde edilmiş olup, 32 si T1(%64) ve 9’u LAM7-TUR(18%) majör spoligotip familyaları, ençok izolatın kümelenildiği familyalar olarak belirlenmiştir(177).

Hatay ilimizde 2010-11 yılları arasında izole edilen 19 MTBK suşunun Spoligotipleme metodu uygulanarak genotiplendirildiği bir çalışmada majör spoligotip familyaları sırasıyla 7 (%36.8) suşa sahip T1 ve 5 (%26.3) suşa sahip LAM7-TUR olarak belirlenmiştir(178).

Zeytinli ve arkadaşlarının farklı illerde ikamet eden(Şanlıurfa , Osmaniye, Gaziantep, Kahramanmaraş, Antakya, Adana, Mersin) pulmoner tüberkülozlu hastalardan 2007-2010 yılları arasında izole edilmiş 467 *M. tuberculosis* klinik izolatın genotiplendirilmesi amacıyla spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemlerini kullanarak gerçekleştirdikleri bir çalışma sonucunda, klinik izolatların 443’ünün (%94,9) 21 farklı spoligotip paterni gösterdikleri ve major spoligo ailelerin 239 (%51,9) suş içeren T1 ailesi ve 54 (%11,5) suş içeren LAM7-TUR ailesi olduklarını ve 24 (%5.1)’ünün ise SpolDB4 veri tabanındaki hiçbir spolitip paterni ile eşleşmeyen orphan suşlar olduklarını belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada Şanlıurfa ilinden izole edilen 6 klinik izolatın(%1.3) beijing familyasına ait olduğu da belirlenmiştir(179). Bu çalışmada en büyük kümelenme oranına sahip T1 ailesi için tespit edilen %51.2’lik kümelenme oranı ve ikinci büyük aile olan TUR ailesi için

tespit edilen %11.5'lik kümelenme oranı bizim çalışmamızda elde edilen %55.4'lik ve %13.8 kümelenme oranı ile benzer bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmaya dahil edilen ve komşu illerimizden şanlıurfa'dan izole edilen 71 MTBK suşunun major spoligo aileleri %53,5 ile T1 ve %11,2 ile TUR olarak bulunmuş olup elde edilen oranlar, çalışmamızda elde edilen sıra ve oranlarla benzerlik göstermektedir.

Sürücüoğlu ve arkadaşlarının İzmir'de 2006-2009 yılları arasında farklı hastalardan izole etmiş oldukları 79'u ÇİD-TB ve 7'si sadece rifampisine dirençi *M.tuberculosis* suşlarının spoligotipleme ve PCR-RFLP yöntemiyle genotiplendirilmesi sonucunda; klinik izolatların kümelenmiş oldukları major spoligo ailelerinin sırasıyla 33(38%)LAM, 30(35%) T, 6(7%) Haarlem, 2(2%) Beijing, 2(2%) S ve 1(1%) U aileleri olduklarını bildirmişlerdir. İzolatların 6'sı veri tabanındaki herhangi bir aile ile eşleşmemiş olup, orphan olarak belirlenmiştir. 27 farklı spoligo paterni gösteren izolatların en yaygın gösterdikleri paternler sırasıyla %29 ile SIT41, SIT53, SIT206, SIT7, SIT367, SIT1261, SIT131, SIT284, SIT1(Beijing), SIT4 SIT47 olduğu rapor edilmiştir(180).

Çavuşoğlu ve arkadaşlarının İzmir'de 1996-2014 yılları arasında TB hastalarından elde ettikleri 470 *M.tuberculosis* klinik izolatın antimikrobiyal duyarlılıkları ile genotipik varyasyonları arasındaki olası ilişkileri belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmaları sonucunda, 470 *M.tuberculosis* suşu için 132 farklı spoligo peterni tanımlamış ve bunlardan 380'i için 46 farklı küme belirlenmiştir. Majör spoligotip ailelerinin T1(%24.7) ve TUR(%8.1) olarak belirlendiği bu çalışmada elde edilen oranlar bizim çalışmamızdan elde edilen oranlardan düşük olarak bulunmuş olunmasına rağmen, major aileler yönünden benzerlik göstermektedir(181).

Aktaş ve arkadaşlarının spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile Zonguldak'taki *M.tuberculosis* izolatlarının moleküler epidemiyolojisini ve biyolojik çeşitliliğini değerlendirmek amacıyla 128 MTBK klinik izolatı ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında majör spoligotipleme ailelerinin sırasıyla 28 (%21.8) T1 ve 18 (%14) TUR aileleri olduğunu belirlemişlerdir. Her iki baskın aile için verdikleri kümelenme oranları çalışmamızdaki oranlardan düşük olmasına rağmen, majör spoligotip ailelerinin sıralaması benzer bulunmuştur(182).

Taşbakan ve arkadaşlarının, ilaç duyarlılığı ve genetik profil analizini gerçekleştirmek amacıyla 165 hastadan izole ettikleri 171 ekstrapulmoner yerleşimli klinik izolatın 149'unu spoligotiplendirme yöntemiyle genotiplendirdikleri çalışmalarında, izolatların 62(%41.6)'sinin T1 familyasına, 11(% 7.4)'inin LAM7-TUR familyasına ait olduğunu rapor etmişlerdir. Baskın spoligotipleme aile sırası benzer olmasına rağmen, her iki aileye ait oranlar çalışmamızdan daha düşük olarak bulunmuştur(183).

Otlu ve arkadaşlarının, Malatyada'ki pulmoner tüberkülozlu hastalardan izole ettikleri 13'ü ÇİD-TB olmak üzere toplam 220 klinik izolatın, majör spoligotip profillerini belirlemek amacıyla spoligotipleme ve IS6110-RFLP yöntemlerini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmaları sonucunda; 38'i unique olmak üzere 64 farklı spoligotip profili elde etmişlerdir. Majör spoligotip ailelerinin sırasıyla 81(%36.8) izolatlı T1, 26(%11.8) izolatlı TUR ve 24(%10,9) izolatlı Haarlem aileleri olduğunu bildirmişlerdir. Bu aile üyelerinin sayısal oranları çalışmamızdaki oranlarla karşılaştırıldığında düşük olarak bulunmuş olursa da baskın aile sıraları benzer bulunmuştur(184).

Durmaz ve arkadaşlarının 2000-2004 yılları arasında TB'li hastalardan izole ettikleri 145 *M.tuberculosis* klinik izolatın ilaca duyarlılık profilleri ve genotipik varyasyonlarını belirlemek amacıyla IS6110-RFLP, spoligotipleme ve 12-MIRU-VNTR yöntemlerini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 120 izolatın 19 farklı kümede toplandığı ve 25 izolatın unique spoligotip patern gösterdiklerini belirlemişlerdir. İzolatların %82.8'inin kümelendiğini bu çalışmada, %17.2'sinin de unique paterne sahip olduğunu ve %4.1'inin orphan suşlar olduklarını tespit etmişlerdir. Majör spoligotip aileleri açısından incelendiğinde, T1 ailesinin 58(%40) izolat içermesiyle en baskın aile iken %26.9 oran ile 39 izolat içeren LAM7-TUR ailesi ikinci sırada yer almıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla karşılaştırıldığında baskın spoligotip ailelerinin sırası benzerlik göstermiş olsa da bu ailelerdeki sayısal oranlar farklılık göstermektedir(185).

Karagöz ve arkadaşlarının konya ve sivas illerinde tüberkülozlu hastalardan izole ettikleri çoklu ilaca dirençli 200 *M.tuberculosis* suşunu genotiplendirme amacıyla spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemlerini kullanarak

gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 13 farklı spoligotipleme paterni elde etmiş olup, majör spoligotipleme ailelerinin sırasıyla 86(43.0%) üyeli T, 52 (26.0%) üyeli LAM, 16(%8.0) üyeli H, 12(%6.0) üyeli X, 12(%6.0) üyeli S, 12(%6.0) üyeli Beijing ve 10 (%5.0) üyeli U aileleri olduğunu bildirmişleridir. Ayrıca en çok izolatın kümелendiği SIT paternleri incelendiğinde, 72(%36.0) izolat içeren SIT53 en büyük kümeyi oluştururken, onu sırasıyla 26(%13.0) izolat içeren SIT41 ve 20(%10) izolat içeren SIT261 izlemiştir. SIT1105, SIT91, SIT35, SIT1073 ve SIT1'in her biri 12(%6.0) izolat içeriyordu. 8(%4.0)'er izolat içeren SIT608 ve SIT363'ü, her biri 2(%1.0) izolatından oluşan SIT20, SIT50, SIT34'ün takip ettiğini bildirmişlerdir(186). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ile karşılaştırıldığında, bu ailelerdeki sayısal oranlar farklılık göstermiş olsa da, gerek baskın aile sıralaması gerekse izolatların en çok kümелendiği SIT paternleri büyük oranda benzerlik göstermektedir.

Mersin ilimizde, spoligotiplendirme ve 15 lokus MIRU-VTR yöntemleri ile 96 ÇİD-MTBK izolatın klonal ilişki yönünden değerlendirildiği bir çalışmada, majör spoligotip ailelerin %40.86 ile T1, %17.20 ile Beijing, %9.67 ile LAM9 ve %8.60 ile LAM7-TUR olduğu bildirilmiştir⁽¹⁸⁷⁾. Türkiye'nin farklı illerinde ikamet eden hastalardan izole edilen MTBK suşlarıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, en sık karşılaşılan majör spoligo aileleri ve en çok izolatın kümелendiği SIT paternleri hem ülkemizdeki diğer çalışmalarla hem de çalışmamız ile farklı bulunmuştur.

Çukurova bölgesinde, 51'i T.C vatandaşı 49'u yabancı uyruklu hastalara ait klinik materyallerden izole edilen ve 52'si en az bir anti-tüberküloz ilaca dirençli 100 MTBK izolatının, MIRU-VNTR ve TB-SPRINT metotları ile klonal ilişki yönünden değerlendirildiği bir çalışmada, hem yabancı uyruklu hem de ülkemiz vatandaşlarından izole edilen suşların oluşturduğu majör spoligotip ailelerinin T1(%45.9) ve TUR(%28.6) olduğunu ve en yaygın spoligotiplerin sırasıyla TUR ailesi içerisinde yer alan SIT41(%27.5) ve T1 ailesi içerisinde yer alan SIT53(%25.5) olduğunu bildirmişlerdir(188). İzolatların en çok kümелendiği Spoligotipler farklılık göstermiş olsa da, major spoligotip aile sıralaması çalışmamız ile benzer bulunmuştur.

Çalışmamızda incelediğimiz 30'u ÇİD ve 35'i herhangi bir primer anti-tüberküloz ilaca dirençli 65 MTBK izolatının spoligotiplenmesi sonucunda %81.53

gibi yüksek bir kümelenme oranı elde edilmiş olup, ülkemizde daha önce Durmaz ve ark.(%77) Gencer ve Ark.(%76) ve Kısa ve ark.(%85) tarafından spoligotipleme yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Bu oran Meksika(%66), Suudi Arabistan(%59.5) ve Hindistan(%43.5) gibi ülkelerde ilaca dirençli izolatlarla yapılan çalışmalarda elde edilen kümelenme oranlarından yüksek olsa da, Zimbabwe (%84,1) ve Finlandiya(%90) gibi ülkelere bildirilen oranlardan daha düşük olarak bulunmuştur(189,190,191,192,193,194,195,196,197).

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre izolatlarımızın %36,92(24)'si T1 ailesi içerisinde yer alan SIT53 ve %12,31(8)'i TUR ailesi içerisinde yer alan SIT41, %10,77(7)'sin herhangi bir familya içerisine dahil edilmeyen SIT2560 ve %9,23(6)'ünün T1 familyası içerisinde yer alan SIT284 spoligo tipinde kümelendiği saptanmıştır. İzolatların en çok kümelendiği SIT53(%36,92) ve SIT41(%12,31) spolitip sırası Sürücüoğlu ve arkadaşlarının İzmir'de yaptığı ve Zozio ve arkadaşlarının Ankara ve Malatya illerinde yapmış olduğu çalışmaların sonuçlarıyla örtüşmesine de ülkemizdeki yapılan birçok çalışmada elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir(180,176).

7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bölgemizde bulunan MTBK izolatlarımızın kökenlerinin moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesini ve belirlenen genotiplerin filogenetik ilişkisine ek olarak bu genotiplerin direnç kalıpları ile arasındaki muhtemel ilişkiyi araştırmayı amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmamızda;

1. Çalışmaya dahil ettiğimiz toplam 65 MTBK izolatımızı spoligotipleme metodu ile analiz ettiğimizde; 19 farklı spoligotip paternine dağıldıklarını ve 53'ünün 7 farklı spoligotipinde kümelenirken 12 izolatın tek üyeli unique profiller oluşturduklarını (Tablo 13),
2. MIRU-VNTR yöntemiyle sonuçları değerlendirdiğimizde ise izolatlarımızın 47'sinin 9 küme de yoğunlaştığı ve 18'inin de tek üyeli olmak üzere toplam 27 farklı kümeye dağıldıklarını (Şekil 4.7) ve bu durumun MTBK üyelerinin genotiplendirilmesinde kullanılan spoligotipleme yönteminin literatürde belirttiği gibi MIRU-VNTR yönteminden daha düşük bir ayırım gücüne sahip olduğunu
3. Spoligotipleme verilerimize göre en çok üyeye sahip ailelerin %55.4 ile T1 ve %13.8 ile TUR olduğunu(Tablo 13),
4. İzolatlarımız arasında en yaygın spoligotiplerin ise 24 (%36,92) izolat ile T1 ailesi içerisinde yer alan SIT53 ve 8 (%12,31) izolat ile TUR ailesi içerisinde yer alan SIT41 olduğunu(Tablo 13),
5. Birden çok üyeli kümelerin genellikle farklı illerden gelen hastalara ait karışık izolatlardan oluştuğunu ve MIRU-VNTR yöntemi ile analizi sonucunda klonal ilişki bulunmadığını,
6. MDR izolatlarımız ile INH-R izolatlarımızın çalışmamızdaki en çok üyeye sahip T1 ailesi içerisinde yoğunlaştıklarını ve çalışmamızdaki baskın spoligotip aile sıralaması ile uyumlu olduğunu (Tablo 14),
7. İlaça dirençle ilgili mutasyonların belirlenmesinde kullanılan genotipik test sonucunda, rifampisin direnci ile ilgili mutasyonların en çok rpoB geninin

531. kodonunda TCG/TTG mutasyonunun, izoniazid'e direncin ise katG geninin 315.Kodonunda AGC/ACC(Ser315Thr) mutasyonunun ve inhA gen bölgesinin -15 pozisyonunda C/T mutasyonlarının dirençten sorumlu yaygın mutasyonlar olduğunu(Tablo 14),

8. MDR suşlarımız arasında iki farklı hastaya ait klinik materyallerinden izole edilen biri İstanbul diğeri de Ukrayna'da ikamet eden ve aynı spolgotip paternine sahip Beijing izolatının olduğunu, toplam MDR suşları arasındaki %3.1'lik oranla olmasıyla ülkemizdeki diğerk çalışmalarda edilen oranlar aralığında olduğu,

9. Çalışmaya dahil ettiğimiz izolatlarımız arasında konak adaptasyonu daha çok hayvanlar olan *M.bovis* izolatının bulunduğunu tespit ettik

Çalışmamız, bölgemizdeki şu anda dolaşımda olan DR-TB ve MDR-TB suşlarının genotiplerinin belirlenmesi için bir başlangıç verisi oluştursa da, DR-TB ve MDR-TB suşlarının genotipik dağılımlarının belirlenmesi ve Özellikle bölgemizde bulunan Batman ve Şanlıurfa illerinde tespit edilmiş olan çoklu ilaca direnç ile ilişkilendirilen ve küresel yayılma eğilimi olan Beijing suşlarının çalışmamızda da tespit edilmiş olması, bu suşların bölgemizdeki yayılımının belirlenmesi için daha kapsamlı çalışmalara olan ihtiyacı ortaya koymaktadır.

Ayrıca bölgemizde izole edilen çoklu ilaç dirençli tüberküloz suşlarının genotiplendirilmesi amacı ile kullandığımız spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemlerinin birlikte kullanımı sonucu her ne kadar izolatlarımız arasında klonal bir ilişki tespit edilememiş olsa da, elde edilen yüksek kümelenme oranı benzer çalışmaların periyodik olarak tekrarlanarak baskın MTBK genotiplerinin yıllar içerisindeki muhtemel değişikliğinin izlenmesinin ülkemizde sürdürülmekte olan tüberküloz korunma ve kontrol programlarının başarısının devamlılığı amacı ile gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Rev Microbiol. 2018;16(4):202-213. doi:10.1038/nrmicro.2018.8
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. Available from:<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565714> Erişim tarihi:21.11.2021
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report.; 2021. Available from:<https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>. Erişim tarihi:25.11.2021
4. Gagneux S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2012;367(1590):850-859. doi:10.1098/rstb.2011.0316
5. Ravigliione MC, Smith IM. XDR Tuberculosis — Implications for Global Public Health. N Engl J Med. 2007;356(7):656-659. doi:10.1056/NEJMp068273
6. World Health Organization. Global Tuberculosis Report.; 2018. Available from:<https://apps.who.int/iris/handle/10665/274453>. Erişim tarihi:06.02.2021
7. World Health Organization. Global Tuberculosis Report.; 2020. Available from:<https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>. Erişim tarihi:08.03.2021
8. World Health Organization. WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 4: Treatment – Drug-Resistant Tuberculosis Treatment.; 2021.
9. MacNeil A, Glaziou P, Sismanidis C, Date A, Maloney S, Floyd K. Global epidemiology of tuberculosis and progress toward meeting global targets — worldwide, 2018. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69(11):281-285. doi:10.15585/mmwr.mm6911a2
10. Barbier M, Wirth T. The Evolutionary history, demography, and spread of the *mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiol Spectr. 2016;4(4):1-21. doi:10.1128/microbiolspec.tb2-0008-2016
11. Foxman B. Molecular epidemiology: Focus on Infection. Am J Epidemiol. 2001;153(12):1135-1141. doi:10.1093/aje/153.12.1135
12. Houben RMGJ, Glynn JR. A systematic review and meta-analysis of molecular epidemiological studies of tuberculosis: development of a new tool to aid interpretation. Trop Med Int Heal. 2009;14(8):892-909. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02316.x
13. Kato-Maeda M, Metcalfe JZ, Flores L. Genotyping of *Mycobacterium*

tuberculosis: application in epidemiologic studies. *Future Microbiol.* 2011;6(2):203-216. doi:10.2217/fmb.10.165

14. Hayman J. *Mycobacterium ulcerans*: An infection from jurassic time? *Lancet.* 1984;324(8410):1015-1016. doi:10.1016/S0140-6736(84)91110-3
15. Groenen PMA, Bunschoten AE, Soolingen D van, Erftbden JDA van. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol.* 1993;10(5):1057-1065. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x
16. Mazars E, Lesjean S, Banuls A-L, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(4):1901-1906. doi:10.1073/pnas.98.4.1901
17. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):406-409. doi:10.1128/jcm.31.2.406-409.1993
18. Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon S V. Myths and misconceptions: The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(7):537-544. doi:10.1038/nrmicro2165
19. Brosch R, Gordon S V., Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS.* 2002;99(6):3684-3689. doi:10.1073/pnas.052548299
20. Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, et al. Erratum: Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: Insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP. *J Bacteriol.* 2006;188(8):3162-3163. doi:10.1128/JB.188.8.3162-3163.2006
21. Gutacker MM, Smoot JC, Migliaccio CAL, et al. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics.* 2002;162(4):1533-1543. doi:10.1093/genetics/162.4.

22. Baker L, Brown T, Maiden MC, Drobniewski F. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(9):1568-1577. doi:10.3201/eid1009.040046
23. A Boire N. Tuberculosis: From an untreatable disease in antiquity to an untreatable disease in modern times? *J Anc Dis Prev Remedies*. 2013;01(02). doi:10.4172/2329-8731.1000106
24. Iwai K, Maeda S, Murase Y. Archaeology of tubercle bacilli and tuberculosis. *Kekkaku*. 2010;85(5):465-475.
25. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg*. 2017;58(1):E9-E12. doi:10.15167/2421-4248/jpmh2017.58.1.728
26. Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(6):2091-2094. doi:10.1073/pnas.91.6.2091
27. M.J. Allison, D. Mendoza AP. Documentation of a case of tuberculosis in Pre-Columbian America. *Am Rev Respir Dis*. 1973;107(6):985-991. doi:10.1164/arrd.1973.107.6.985
28. Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC, Holcomb TA. Pre-Columbian tuberculosis in Northern Chile: Molecular and skeletal evidence. *Am J Phys Anthropol*. 1995;98(1):37-45. doi:10.1002/ajpa.1330980104
29. C.A. Roberts JEB. *The Bioarchaeology of Tuberculosis. A Global View on a Reemerging Disease*. University of Florida Press; 2003.
30. Barış Y. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Published online 2003:1-7.
31. Barış Yİ. Dünyada tüberküloz'un tarihi. *Konuralp Tıp Derg*. 2010;3(2):1-4.
32. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med*. 2006;100(11):1862-1870. doi:10.1016/j.rmed.2006.08.006
33. Murray JF, Rieder HL, Finley-Crowwhite A. The King's Evil and the Royal Touch: The medical history of scrofula. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20(6):713-

716. doi:10.5588/ijtld.16.0229

34. Barnes DS. Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. *Microbes Infect.* 2000;2(4):431-440. doi:10.1016/S1286-4579(00)00323-3
35. Seber E. Tüberkülozun dünü. *ANKEM Derg.* 2010;24(Ek 2):52-60.
36. Atılgan Adnan. Pulmonar Tüberkülozlu Hastaların Balgam Örneklerinden izole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarında Rifampisin direncinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması. Çukurova Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2015, Adana (Danışman: Prof. Dr. Fatih KÖKSAL).
37. Yakıcı G. Çoklu İlaç Dirençli(ÇİD) *Mycobacterium Tuberculosis* izolatlarının filogenetik ilişkilendirilmesinde kullanılan Is6110, Miru- Vntr(Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Of Tandem Repeat), spoligotyping yöntemlerinin karşılaştırılması. Çukurova Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2013, Adana (Danışman: Prof. Dr. Fatih KÖKSAL).
38. Kerantzas CA, Jacobs WR. Origins of combination therapy for tuberculosis: Lessons for future antimicrobial development and application. *MBio.* 2017;8(2). doi:10.1128/mBio.01586-16
39. Çalık Sitti. Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Bölge Tüberküloz Laboratuvarına Gönderilen Balgam Örneklerinden İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının major ve minör antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2012, Adana (Danışman: Prof. Dr. Fatih KÖKSAL).
40. Palomino JC, Leão SC R V. Tuberculosis. 1st Ed. Antwerp; 2007, p:63-64.
41. Fatih Köksal AY. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. In: 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. ; 2003:34-46.
42. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The Mycobacteria: An introduction to nomenclature and pathogenesis. *OIE Rev Sci Tech.* 2001;20(1):21-54. doi:10.20506/rst.20.1.1265
43. Brennan P. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2003;83(1-3):91-97. doi:10.1016/S1472-9792(02)00

44. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol.* 1997;1(4):579-588. doi:10.1016/S1367-5931(97)80055-5
45. Harshey RM, Ramakrishnan T. Rate of Ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37R(v). *J Bacteriol.* 1977;129(2):616-622. doi:10.1128/jb.129.2.616-622.1977
46. Koneman EW, Winn WJ, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P WG (eds). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Seventh ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2017, p:1219-1258.
47. Riedel S, Morse SA, Mietzner T MSJM and A. *Medical Microbiology*. 28 Eds. McGraw-Hill Education; 2019, p:212-245.
48. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998;393(6685):537-544. doi:10.1038/31159
49. Mizrahi V, Andersen SJ. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis* . What have we learnt from the genome sequence? *Mol Microbiol.* 1998;29(6):1331-1339. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01038.x
50. Jagielski T, Minias A, van Ingen J, et al. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(2):239-290. doi:10.1128/CMR.00055-15
51. Tomioka H. Bacteriology of mycobacteria: taxonomic and morphological characteristics. *Nihon Rinsho.* 1998;56(12):3001-3007.
52. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res.* 2004;120(4):290-304.
53. Johansen MD, Herrmann JL, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(7):392-407. doi:10.1038/s41579-020-0331-1
54. Tille, Patricia M. A. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Elsevier; 2014.
55. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller MA. *Medical Microbiology*. Seventh Ed. Elsevier Mosby; 2013, p:235-246.

56. Boddingtonhaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, Bottger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol. 1990;28(8):1751-1759. doi:10.1128/jcm.28.8.1751-1759.1990
57. Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. Res Vet Sci. 2014;97(S):S5-S19. doi:10.1016/j.rvsc.2014.02.009
58. Mostowy S, Onipede A, Gagneux S, et al. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. J Clin Microbiol. 2004;42(8):3594-3599. doi:10.1128/JCM.42.8.3594-3599.2004
59. Comas I, Coscolla M, Luo T, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. Nat Genet. 2013;45(10):1176-1182. doi:10.1038/ng.2744
60. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. Lancet Infect Dis. 2007;7(5):328-337. doi:10.1016/S1473-3099(07)70108-1
61. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009;56(2):103-111. doi:10.1111/j.1574-695X.2009.00555.x
62. Tuncer Ö. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks klinik izolatlarında izoniazid direncine neden olan dışa atım pompalarının saptanması. Hacettepe Üniversitesi. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2016, Ankara (Danışman: Doç. Dr. Zeynep SARIBAŞ).
63. World Health Organization. World Health Organization & Stop TB Partnership. (2010). The Global Plan to Stop TB 2011-2015: Transforming the Fight towards Elimination of Tuberculosis. Vol 148. From available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44437>. Erişim tarihi:17.04.2021
64. Didem Ö. Primer Anti-Tüberküloz ilaçlara dirençli ve duyarlı *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında Pirazinamid direnci ile ilişkili pncA, rpsA ve panD gen mutasyonlarının araştırılması. Mersin Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2019, Mersin (Danışman: Prof. Dr. Gönül ASLAN).

65. Çevirme A. Dünyada ve Türkiye ' de Tüberkülozun önlenmesi ve kontrolü ile ilgili yasalar. *Turkiye Klin J Intern Med Nurs-Special Top.* 2017;3(January):1-6.
66. Ahmed MM, Velayati AA, Mohammed SH. Epidemiology of multidrug-resistant, extensively drug resistant, and totally drug resistant tuberculosis in Middle East countries. *Int J Mycobacteriology.* 2016;5(3):249-256. doi:10.1016/j.ijmyco.2016.08.008
67. Iseman MD. Tailoring a time-bomb. Inadvertent genetic engineering. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132(4):735-736. doi:10.1164/arrd.1985.132.4.735
68. G.B. Migliori, G. De Iaco, G. Besozzi et al. First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. *Euro Surveill.* 2007;12(20):3194. doi:10.2807/esw.12.20.03194
69. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet.* 2010;375(9728):1830-1843. doi:10.1016/S0140-6736(10)60410-2
70. World Health Organization. The End TB Strategy.; 2015. Available from:<https://apps.who.int/iris/handle/10665/191102>. Erişim tarihi:03.04.2021
71. Yayın SBASB. Türkiye'de Verem Savaşı 2019 Raporu.; 2020. Available from:https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/kurumsal/yayinlarimiz/Raporlar/Turkiyede_Verem_Savasi_2020_Raporu.pdf
72. Brzostek A, Sajduda A, Sliwiński T, et al. Molecular characterisation of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8(8):1032-1035.
73. Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics.* 2014;3(3):317-340. doi:10.3390/antibiotics3030317
74. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):354-373. doi:10.1093/femsre/fux011
75. Johnson R, Streicher EM, Louw GE, Warren RM, van Helden PD, Victor TC. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Issues Mol Biol.* 2006;8(2):97-111.
76. Vilchèze C, Jacobs WR. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the

- scope of genetics. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:35-50. doi:10.1146/annurev.micro.61.111606.122346
77. Wahab HA, Choong Y-S, Ibrahim P, Sadikun A, Scior T. Elucidating isoniazid resistance using molecular modeling. *J Chem Inf Model.* 2009;49(1):97-107. doi:10.1021/ci8001342
 78. Rawat R, Whitty A, Tonge PJ. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(24):13881-13886. doi:10.1073/pnas.2235848100
 79. Wang X, Gu J, Wang T, et al. Comparative analysis of mycobacterial NADH pyrophosphatase isoforms reveals a novel mechanism for isoniazid and ethionamide inactivation. *Mol Microbiol.* 2011;82(6):1375-1391. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07892.x
 80. Oliveira JS, Pereira JH, Canduri F, et al. Crystallographic and Pre-steady-state Kinetics Studies on Binding of NADH to Wild-type and Isoniazid-resistant Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol.* 2006;359(3):646-666. doi:10.1016/j.jmb.2006.03.055
 81. Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, Drobniowski F, Cirillo DM, Nikolayevskyy V. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(2):61-68. doi:10.1016/j.cmi.2016.09.008
 82. Tseng ST, Tai CH, Li CR, Lin CF, Shi ZY. The mutations of katG and inhA genes of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015;48(3):249-255. doi:10.1016/j.jmii.2013.08.018
 83. Müller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet.* 2013;29(3):160-169. doi:10.1016/j.tig.2012.11.005
 84. Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(1):13-21. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00483-3
 85. Mitchison DA. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest.* 1979;76(6 Suppl): 771-781. doi:10.1378/chest.76.6_supplement.771

86. Blanchard JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Annu Rev Biochem. 1996;65(1):215-239. doi:10.1146 /annurev.bi.65.070196.001243
87. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993;341(8846):647-651. doi:10.1016/0140-6736(93)90417-F
88. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuber Lung Dis. 1998;79(1):3-29. doi:10.1054/tuld.1998.0002
89. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir Res. 2001;2(3):164-168. doi:10.1186/rr54
90. Caws M, Duy PM, Tho DQ, Lan NTN, Hoa DV, Farrar J. Mutations prevalent among rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam. J Clin Microbiol. 2006;44(7):2333-2337. doi:10.1128/JCM.00330-06
91. Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(4):1075-1077. doi:10.1128/AAC.44.4.1075-1077.2000
92. Siu GKH, Zhang Y, Lau TCK, et al. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother. 2011;66(4):730-733. doi:10.1093/jac/dkq519
93. Yang B, Koga H, Ohno H, et al. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother. 1998;42(5):621-628. doi:10.1093/jac/42.5.621
94. Cavusoglu C, Karaca-Derici Y, Bilgic A. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. Clin Microbiol Infect. 2004;10(7):662-665. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00917.x

95. Burman WJ, Jones BE. Treatment of HIV-related tuberculosis in the era of effective antiretroviral therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(1):7-12. doi:10.1164/ajrccm.164.1.2101133
96. Traore H, Fissette K, Bastian I, Devleeschouwer M, Portaels F. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000;4(5):481-484.
97. Comas I, Borrell S, Roetzer A, et al. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase. 2012;44(1):106-110. doi:10.1038/ng.1038.
98. Brandis G, Hughes D. Genetic characterization of compensatory evolution in strains carrying rpoB Ser531Leu, the rifampicin resistance mutation most frequently found in clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68 (11): 2493-2497. doi:10.1093/jac/dkt224
99. De Vos M, Müller B, Borrell S, et al. Putative compensatory mutations in the rpoC gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2):827-832. doi:10.1128/AAC.01541-12
100. Takayama K, Kilburn JO. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33(9):1493-1499. doi:10.1128/AAC.33.9.1493
101. Mikusova K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(11):2484-2489. doi:10.1128/AAC.39.11.2484
102. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003;7(1):6-21.
103. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, et al. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(3):540-543. doi:10.1128/AAC.41.3.540
104. World Health Organization. Guidelines for drug susceptibility testing for second-line anti-tuberculosis drugs for DOTS-plus. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/83807> Erişim tarihi: 06.01.2021

105. Cheng AFB, Yew WW, Chan EWC, Chin ML, Hui MMM, Chan RCY. Multiplex pcr Amplimer conformation analysis for rapid detection of gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(2):596-601. doi:10.1128/AAC.48.2.596-601.2004
106. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol.* 2009;2(1):40-61. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x
107. Aubry A, Pan X-S, Fisher LM, Jarlier V, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* DNA Gyrase: Interaction with Quinolones and Correlation with Antimycobacterial Drug Activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1281-1288. doi:10.1128/AAC.48.4.1281-1288.2004
108. Sun Z, Zhang J, Zhang X, Wang S, Zhang Y, Li C. Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(2):115-121. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.10.014
109. Da Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(7):1417-1430. doi:10.1093/jac/dkr173
110. Mathys V, Wintjens R, Lefevre P, et al. Molecular Genetics of para - Aminosalicyclic Acid Resistance in Clinical Isolates and Spontaneous Mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):2100-2109. doi:10.1128/AAC.01197-08
111. Zhang Y. The Magic bullets And tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45(1):529-564. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.100120
112. Palomino J, Martin A. Tuberculosis clinical trial update and the current anti-tuberculosis drug portfolio. *Curr Med Chem.* 2013;20(30):3785-3796. doi:10.2174/09298673113209990166
113. Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, et al. OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. Hopewell P, ed. *PLoS Med.* 2006;3(11):e466. doi:10.1371/journal.pmed.0030466

114. Kim SJ. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J*. 2005;25(3):564-569. doi:10.1183/09031936.05.00111304
115. Zhang J, Mi L, Wang Y, et al. Genotypes and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Shihezi, Xinjiang Province, China. *BMC Res Notes*. 2012;5. doi:10.1186/1756-0500-5-309
116. Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, Naidoo K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5):1138-1151. doi:10.1093/jac/dkx506
117. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, et al. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(14):4865-4870. doi:10.1073/pnas.0305634101
118. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis.; 2018. Available from:<https://apps.who.int/iris/handle/10665/275469>. Erişim tarihi: 12.03.2021
119. World Health Organization. Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis (STAG-TB). Report on Conclusions and Recommendations. Available from:<https://www.who.int/groups/strategic-and-technical-advisory-group-for-tuberculosis> Erişim tarihi: 30.04.2021
120. Martin A, von Groll A, Fissette K, Palomino JC, Varaine F, Portaels F. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Resistance to Second-Line Drugs by Use of the Manual Mycobacterium Growth Indicator Tube System. *J Clin Microbiol*. 2008;46(12):3952-3956. doi:10.1128/JCM.01171-08
121. Ardito F, Posteraro B, Sanguinetti M, Zanetti S, Fadda G. Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2001;39(12):4440-4444. doi:10.1128/JCM.39.12.4440-4444.2001
122. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. *PLoS Med*. 2009;6(2):e1000002. doi:10.1371/journal.pmed.1000002
123. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, et al. Evaluation of the INNO-LiPA

- Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(10):2093-2098. doi:10.1128/AAC.41.10.2093
124. Leylabadlo HE, Kafil HS, Yousefi M, Aghazadeh M, Asgharzadeh M. Pulmonary tuberculosis diagnosis: Where we are? *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2016;79(3):134. doi:10.4046/trd.2016.79.3.134
 125. Suhail Ahmad NMA-M& EM. Comparison of performance of two DNA line probe assays for Rapid detection of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Exp Biol*. 2009;47:454-457.
 126. Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H. Comparison of Two Commercially Available DNA Line Probe Assays for Detection of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):350-352. doi:10.1128/JCM.44.2.350-352.2006
 127. Uddin MKM, Rahman A, Ather MF, et al. Distribution and Frequency of rpoB Mutations Detected by Xpert MTB/RIF Assay Among Beijing and Non-Beijing Rifampicin Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Bangladesh. *Infect Drug Resist*. 2020;Volume 13:789-797. doi:10.2147/IDR.S240408
 128. Hain Lifescience. Geno Type MTBDR plus. Hain lifescience. Published 2015. <https://www.hain-lifescience.de/en/> Erişim tarihi:25.02.2021
 129. Raveendran R, Wattal C, Oberoi J, Goel N, Datta S, Prasad K. Utility of GenoType MTBDRplus assay in rapid diagnosis of multidrug resistant tuberculosis at a tertiary care centre in India. *Indian J Med Microbiol*. 2012;30(1):58-63. doi:10.4103/0255-0857.93034
 130. Bai Y, Wang Y, Shao C, Hao Y, Jin Y. GenoType MTBDRplus assay for rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150321. doi:10.1371/journal.pone.0150321
 131. Gui X-H, Xu P, Zhao M, et al. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2010;33(1):43-45.
 132. Miotto P, Piana F, Penati V, Canducci F, Migliori GB, Cirillo DM. Use of Genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. *J Clin*

- Microbiol. 2006;44(7):2485-2491. doi:10.1128/JCM.00083-06
133. Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, et al. The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. Nacy CA, ed. MBio. 2017;8(4). doi:10.1128/mBio.00812-17
 134. Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, Near-Patient Technology. J Clin Microbiol. 2010;48(1):229-237. doi:10.1128/JCM.01463-09
 135. Coll F, McNerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. Genome Med. 2015;7(1):51. doi:10.1186/s13073-015-0164-0
 136. Katale BZ, Mbelele PM, Lema NA, et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates and clinical outcomes of patients treated for multidrug-resistant tuberculosis in Tanzania. BMC Genomics. 2020;21(1):174. doi:10.1186/s12864-020-6577-1
 137. Satta G, Lipman M, Smith GP, Arnold C, Kon OM, McHugh TD. *Mycobacterium tuberculosis* and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential? Clin Microbiol Infect. 2018;24(6):604-609. doi:10.1016/j.cmi.2017.10.030
 138. Meehan CJ, Moris P, Kohl TA, et al. The relationship between transmission time and clustering methods in *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology. EBioMedicine. 2018;37:410-416. doi:10.1016/j.ebiom.2018.10.013
 139. Pankhurst LJ, del Ojo Elias C, Votintseva AA, et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: A prospective study. Lancet Respir Med. 2016;4(1):49-58. doi:10.1016/S2213-2600(15)00466-X
 140. Gygli SM, Keller PM, Ballif M, et al. Whole-Genome Sequencing for Drug Resistance Profile Prediction in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(4). doi:10.1128/AAC.02175-18
 141. Campelo TA, Cardoso de Sousa PR, Nogueira L de L, Frota CC, Zuquim Antas PR. Revisiting the methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis*: what has the new millennium brought thus far? Access Microbiol. 2021;3(8).

doi:10.1099/acmi.0.000245

142. Sun J-R, Lee S-Y, Perng C-L, Lu J-J. Detecting *Mycobacterium tuberculosis* in Bactec MGIT 960 Cultures by Inhouse IS6110-based PCR Assay in Routine Clinical Practice. J Formos Med Assoc. 2009;108(2):119-125. doi: 10.1016/S0929-6646(09)60042-5
143. Das S, Mangold KA, Shah NS, Peterson LR, Thomson RB, Kaul KL. Performance and Utilization of a Laboratory-Developed Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in a low-prevalence area. Am J Clin Pathol. 2020;154(1):115-123. doi:10.1093/ajcp/aqaa031
144. Theron G, Peter J, Meldau R, et al. Accuracy and impact of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of smear-negative or sputum-scarce tuberculosis using bronchoalveolar lavage fluid. Thorax. 2013;68(11):1043-1051. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-203485
145. Detjen AK, DiNardo AR, Leyden J, et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: a systematic review and meta-analysis. Lancet Respir Med. 2015;3(6):451-461. doi:10.1016/S2213-2600(15)00095-8
146. Akdoğan Kıttana FN. *Mycobacterium tuberculosis* klinik izolatlarında yeni antitüberküloz ilaçlar olan Bedaquiline ve Delamanid'in MİK değerlerinin ve direnç neden olan mutasyonların saptanması. Hacettepe Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2020, Ankara (Danışman: Doç. Dr. Alpaslan ALP).
147. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: Current insights. Clin Microbiol Rev. 2006;19(4):658-685. doi:10.1128/CMR.00061-05
148. Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. Clin Microbiol Infect. 2002;8(11):694-704. doi:10.1046/j.1469-0691.2002.00460.x
149. Hermans PWM, Van Soolingen D, Dale JW, et al. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: A useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1990;28(9):2051-2058. doi:10.1128/jcm.

28.9.2051-2058.1990

150. Van Soolingen D, De Haas PEW, Hermans PWM, Groenen PMA, Van Embden JDA. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1993;31(8):1987-1995. doi:10.1128/jcm.31.8.1987-1995.1993
151. Gagneux S, ed. Strain Variation in the *Mycobacterium tuberculosis* complex: its role in biology, epidemiology and control. Vol 1019. Springer International Publishing; 2017. doi:10.1007/978-3-319-64371-7
152. Jagielski T, Van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J. Current methods in the molecular typing of *mycobacterium tuberculosis* and other Mycobacteria. Biomed Res Int. 2014;2014. doi:10.1155/2014/645802
153. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997;35(4):907-914. doi:10.1128/jcm.35.4.907-914.1997
154. Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Infect Immun. 1991;59(8):2695-2705. doi:10.1128/iai.59.8.2695-2705.1991
155. van der Zanden AGM, Kremer K, Schouls LM, et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. J Clin Microbiol. 2002;40(12):4628-4639. doi:10.1128/JCM.40.12.4628-4639.2002
156. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: Mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. 2006;6:1-17. doi:10.1186/1471-2180-6-23
157. Van Der Zanden AGM, Kremer K, Schouls LM, et al. Improvement of Differentiation and Interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. J Clin Microbiol. 2002;40(12):4628-4639. doi:10.1128/JCM.40.12.4628-

4639.2002

158. Kremer K, Glynn JR, Lillebaek T, et al. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. J Clin Microbiol. 2004;42(9):4040-4049. doi:10.1128/JCM.42.9.4040-4049.2004
159. Cronin WA, Golub JE, Magder LS, et al. Epidemiologic Usefulness of spoligotyping for secondary typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS 6110. J Clin Microbiol. 2001;39(10):3709-3711. doi:10.1128/JCM.39.10.3709-3711.2001
160. Maes M, Kremer K, van Soolingen D, Takiff H, de Waard JH. 24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. Tuberculosis. 2008;88(5):490-494. doi:10.1016/j.tube.2008.04.003
161. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. 1998;144(5):1189-1196. doi:10.1099/00221287-144-5-1189
162. Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006;44(12):4498-4510. doi:10.1128/JCM.01392-06
163. Borgdorff MW, van Soolingen D. The re-emergence of tuberculosis: What have we learnt from molecular epidemiology? Clin Microbiol Infect. 2013;19(10):889-901. doi:10.1111/1469-0691.12253
164. Realpe T, Correa N, Rozo JC, et al. Population Structure among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from pulmonary tuberculosis patients in Colombia. Cloeckaert A, ed. PLoS One. 2014;9(4):e93848. doi:10.1371/journal.pone.0093848
165. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. Semin Immunol. 2014;26(6):431-444. doi:10.1016/j.smim.2014.09.012
166. de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum*—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. Picardeau M, ed. PLoS

- Negl Trop Dis. 2010;4(9):e744. doi:10.1371/journal.pntd.0000744
167. Gehre F, Antonio M, Faïhun F, et al. The First Phylogeographic Population Structure and Analysis of Transmission Dynamics of *M. africanum* West African 1— Combining Molecular Data from Benin, Nigeria and Sierra Leone. Arez AP, ed. PLoS One. 2013;8(10):e77000. doi:10.1371/journal.pone.0077000
 168. Wiens KE, Woyczynski LP, Ledesma JR, et al. Global variation in bacterial strains that cause tuberculosis disease: a systematic review and meta-analysis. BMC Med. 2018;16(1):196. doi:10.1186/s12916-018-1180-x
 169. Gardy JL, Johnston JC, Sui SJH, et al. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a Tuberculosis outbreak. N Engl J Med. 2011;364(8):730-739. doi:10.1056/NEJMoa1003176
 170. Mustafa Ali R, Trovato A, Couvin D, et al. Molecular epidemiology and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Baghdad. Biomed Res Int. 2014;2014:1-15. doi:10.1155/2014/580981
 171. Ahmed MM, Mohammed SH, Nasurallah HAA, Ali MM, Couvin D, Rastogi N. Snapshot of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Iraq. Int J Mycobacteriology. 2014;3(3):184-196. doi:10.1016/j.ijmyco.2014.07.006
 172. Haeili M, Darban-Sarokhalil D, Fooladi AAI, et al. Spoligotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from five provinces of Iran. Microbiologyopen. 2013;2(6):988-996. doi:10.1002/mbo3.139
 173. Hadifar S, Fateh A, Pourbarkhordar V, Siadat SD, Mostafaei S, Vaziri F. Variation in *Mycobacterium tuberculosis* population structure in Iran: a systemic review and meta-analysis. BMC Infect Dis. 2021;21(1):2. doi:10.1186/s12879-020-05639-7
 174. Merza MA, Farnia P, Salih AM, Masjedi MR, Velayati AA. The Most predominant spoligopatterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates among Iranian, Afghan-Immigrant, Pakistani and Turkish tuberculosis patients: A comparative analysis. Chemotherapy. 2010;56(3):248-257. doi:10.1159/000316846
 175. Al-Hajoj SAM, Zozio T, Al-Rabiah F, et al. First Insight into the Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. J Clin Microbiol. 2007;45(8):2467-2473. doi:10.1128/JCM.02293-06

176. Zozio T, Allix C, Gunal S, et al. 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 Microbiol. 2005;5(1):44. doi:10.1186/1471-2180-5-44
177. Karşligil T, Bayram A, Ekşi F. Determination of genotypic varieties and genotyping of multiple drug-resistant tuberculosis by the RFLP and spoligotyping methods. Turkish J Med Sci. 2016;46(5):1502-1511. doi:10.3906/sag-1412-5
178. Yula E İM. Hatay ilinde izole edilen *Mycobacterium Tuberculosis* izolatlarının spoligotyping yöntemi ile genotiplendirilmesi. NWSA-MEDICAL Sci. 2012;7:38-43.
179. Oral Zeytinli U, Köksal F. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients in Cukurova Region, Turkey by spoligotyping and MIRU-VNTR methods. Mikrobiyol Bul. 2012;46(2):202-210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22639309>
180. Surucuoglu S, Gunal S, Ozkutuk N, et al. Molecular diversity of drug resistant *Mycobacterium Tuberculosis* strains in Western Turkey. Balkan Med J. 2012;29(2):160-165. doi:10.5152/balkanmedj.2012.012
181. Çavuşoğlu, C., Yilmaz, F. F., Onmuş, İ. R. D., Bozdemir, T., Taşlı, H., & Limoncu MH. Genotype distribution of *Mycobacterium tuberculosis* in the Aegean Region and associated demographic factors. Turkish J Med Sci. 2017;47:1593-1601. doi:10.3906/sag-1607-115
182. Aktaş E, Zozio T, Cömert FB, et al. A first insight into the genetic diversity and population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Zonguldak, Turkey. Clin Microbiol Infect. 2008;14(1):55-59. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01882.x
183. Taşbakan MS, Akdağ D, Kahraman H, Akyol D, Taşbakan M, Çavuşoğlu C. Kültür ile kanıtlanmış akciğer dışı tüberküloz: ilaç duyarlılığı ve genetik profil analizi. Tuberk Toraks. 2018;66(3):234-238. doi:10.5578/tt.67376
184. Otlu B, Durmaz R, Gunal S, Sola C, Zozio T, Rastogi N. Beijing/W and major spoligotype families of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients in Eastern Turkey. New Microbiol. 2009;32(3):255-263.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19845107>

185. Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Allix C, Fauville-Dufaux M, Rastogi N. Population-based molecular epidemiological study of tuberculosis in Malatya, Turkey. *J Clin Microbiol.* 2007;45(12):4027-4035. doi:10.1128/JCM.01308-07
186. Karagoz A, Tutun H, Altintas L, Alanbayi U, Yildirim D, Kocak N. Molecular typing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Turkey. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;23:130-134. doi:10.1016/j.jgar.2020.08.012
187. Burcu GG. Çoklu ilaç dirençli *Mycobacterium Tuberculosis* complex suşlarının spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleriyle moleküler tiplendirilmesi. Mersin Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2020, Mersin (Danışman: Prof. Dr. Gönül ASLAN).
188. Yakici G. Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı ve yabancı uyruklu pulmoner tüberkülozlu hastalardan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarının filogenetik ilişkisinin MIRU-VNTR ve Spoligotipleme ile tespiti. Çukurova Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2020, Adana (Danışman: Prof. Dr. Fatih KÖKSAL).
189. Durmaz R, Zozio T, Gunal S, et al. Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from different regions of Turkey. *Infect Genet Evol.* 2007;7(4):513-519. doi:10.1016/j.meegid.2007.03.003
190. Gencer, B., & Shinnick TM. Molecular genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. *Am J Infect Dis.* 2005;1(1):5-11.
191. Kisa O, Albay A, Baylan O, Tozkoparan E, Acikel CH, Doganci L. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates at the Military Medical Academy in Ankara, Turkey. *Res Microbiol.* 2007;158(4):318-323. doi:10.1016/j.resmic.2007.01.004
192. Kisa O, Tarhan G, Gunal S, et al. Distribution of spoligotyping defined genotypic lineages among drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates in Ankara, Turkey. *PLoS One.* 2012;7(1):e30331. doi:10.1371/journal.pone.0030331
193. Munro-Rojas D, Fernandez-Morales E, Zarrabal-Meza J, et al. Genetic diversity of drug and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* circulating in

- Veracruz, Mexico. Mokrousov I, ed. PLoS One. 2018;13(3):e0193626. doi:10.1371/journal.pone.0193626
194. Varghese B, Supply P, Allix-Béguec C, et al. Admixed phylogenetic distribution of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. Ahmed N, ed. PLoS One. 2013;8(2):e55598. doi:10.1371/journal.pone.0055598
 195. Kulkarni S, Sola C, Filliol I, Rastogi N, Kadival G. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mumbai, India. Res Microbiol. 2005;156(4):588-596. doi:10.1016/j.resmic.2005.01.005
 196. Easterbrook PJ, Gibson A, Murad S, et al. High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a Molecular Epidemiological Study. J Clin Microbiol. 2004;42(10):4536-4544. doi:10.1128/JCM.42.10.4536-4544.2004
 197. Puustinen K, Marjamäki M, Rastogi N, et al. Characterization of finnish *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping. J Clin Microbiol. 2003;41(4):1525-1528. doi:10.1128/JCM.41.4.1525-1528.2003

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	İbrahim Halil	Soyadı	ŞAHİN
Doğum Yeri	Şanlıurfa	Doğum Tarihi	*
Uyruğu	T.C.	Tel	*
E-posta	*		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Dicle Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2022
Tezli Yüksek Lisans	Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2008
Lisans	Selçuk Üniversitesi	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Biyolog	Harran Üniversitesi / Arş. Uyg Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.	2005-2009
Öğretim Görevlisi	Bitlis Eren Üniversitesi/ Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu	2009----

*: Kişisel bilgileri koruma kanunu uyarınca kaldırılmıştır

10. EKLER

10.1. Etik Kurul Kararı

(Kişisel bilgileri koruma kanunu uyarınca kaldırılmıştır)



10.2. İntihal Raporu

Turnitin Originality Report Processed on: 06-Jan-2022 16:32 +03 ID: 1738109514 Word Count: 25921 Submitted: 1 PRİMER ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇLİ MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS KOMPLEKS İZOLATLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE GENOTİPLENDİRİLMESİ By İbrahim Halil Şahin		Similarity Index 6%	Similarity by Source Internet Sources: 6% Publications: 2% Student Papers: 1%
1% match (Internet from 26-Oct-2021) http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/22304/10334771.pdf?isAllowed=y&sequence=3			
< 1% match (Internet from 26-Oct-2021) http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/21763/TEZ10.pdf?isAllowed=y&sequence=3			
< 1% match (Internet from 07-May-2019) http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/1011/e9a0d193-8ade-4805-a803-f342ch68a5ad.pdf?isAllowed=y&sequence=1			
< 1% match (Internet from 19-Jul-2015) http://library.cu.edu.tr/tezler/8241.pdf			
< 1% match (Internet from 01-Jun-2015) http://library.cu.edu.tr/tezler/8546.pdf			
< 1% match (Internet from 09-Jul-2015) http://library.cu.edu.tr/tezler/8855.pdf			
< 1% match () Katherine R. Dickman, Lydia Nabwonga, David P. Keteete, Fred A. Katabazi et al. "Detection of multiple strains of using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda", BMC Infectious Diseases			
< 1% match () Abdullah A. Saati, Muhammad Khurram, Hani Faidah, Abdul Haseeb, Marcello Irili, "A Saudi Arabian Public Health Perspective of Tuberculosis", International Journal of Environmental Research and Public Health			
< 1% match () Thales Alves Camargo, Paulo Rafael Cardoso de Sousa, Lucas de Lima Nogueira, Cristiane Cunha Frota, Paulo Renato Zugniim Antas, "Revisiting the methods for detection : what has the new millennium brought thus far?", Access Microbiology			
< 1% match (Internet from 11-Jul-2019) http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23565en/s23565en.pdf			
< 1% match (Internet from 14-Dec-2020) https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf?ua=1			
< 1% match (Internet from 14-Jul-2016) http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/2012-02/html/2012-46-2-202-210.htm			
< 1% match (Internet from 29-Mar-2015) http://www.mikrobiyolbul.org/global/webelita_pdf/7_Ulusal_Molekuler_ve_Tanisal_Mikrobiyoloji_Kongresi.pdf			
< 1% match (Internet from 27-Oct-2021) https://docplayer.biz.tr/36637638-Tuberkulozun-epidemiyolojik-arastirmalarinda-laboratuvarin-veri.html			

10.3. Makale

Bitlis İli'nde 1998-2008 Yılları Arasında Sıtma Epidemiyolojisi

Malaria Epidemiology in Bitlis From 1998 to 2008

İbrahim Halil Şahin¹, Fadile Yıldız Zeyrek², Mehmet Fatih Aydın³, Hatice Öntürk³, Mikail Basank⁴

¹Bitlis Eren Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Bitlis, Türkiye

²Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

³Bitlis Eren Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Bitlis, Türkiye

⁴İl Sağlık Müdürlüğü, Sıtma Savaş Birimi, Bitlis, Türkiye

ÖZET

Amaç: Sıtma günümüzde, dünyada olduğu gibi Türkiye'de de bir halk sağlığı sorunu olarak önemini korumaktadır. Bu çalışma, Bitlis İl Sağlık Müdürlüğü Sıtma Savaş Biriminin 1998-2008 yılları arasında, saptanan sıtma olgularının incelenerek, ilimizdeki sıtma epidemiyolojisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Yöntemler: Çalışma retrospektif olup, İl Sağlık Müdürlüğü verileri incelenerek yapılmıştır. On bir yıllık periyot içerisinde toplam 86951 kişiden aktif ve pasif sürveyans yöntemiyle periferik kan örneği alınmıştır. Alınan kan örneklerinden ince yayma ve kalın damla kan yaymaları yapılarak Giemsa ile boyanmış ve immersion objektifi ile mikroskopta incelenmiştir.

Bulgular: İncelenen toplam 86951 kan yaymasından 659'unda (%0.75) sıtma paraziti saptanmıştır. Pozitif olguların 368'inin (%55.84) erkek, 291'inin (%44.16) kadın olduğu görülmüştür. Pozitif vakaların en fazla 1998-2000 yılları arasında, Mayıs-Eylül ayları aralığında yoğunlaştığı ve 2001 yılından itibaren önemli bir düşüş gösterdiği gözlemlenmiştir. Olguların 599'unun (%90.9) yerli, 60'ının (%9.1) importe olduğu ve tamamında etkenin *Plasmodium vivax* olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışma ile ilimizde sıtma epidemiyolojisiyle ilgili verilerin ortaya konularak, hastalığın kontrol altına alınmasına katkı sağlanacağı düşünülmektedir. (Türkiye Parazitol Derg 2012; 36: 1-3)

Anahtar Sözcükler: Bitlis, sıtma, epidemiyoloji

Geliş Tarihi: 05.12.2011

Kabul Tarihi: 31.01.2012

ABSTRACT

Objective: Malaria is still an important public health problem both in Turkey and the world. In this investigation, the records of patients with malaria that had been detected by the Health Directorate of Bitlis between 1998 and 2008 were examined.

Methods: The retrospective study was performed on data from the Provincial Health Directorate. During this 11-year period, a total of 86,951 blood samples were taken by active and passive surveillance. Thin and thick blood smears stained with Giemsa were examined by immersion objective under microscope.

Results: A total of 659 (0.75%) malaria cases were detected. Of these cases, 368 (55.84%) were male and 291 (44.16%) female. It was also observed that the positive cases were found mostly between 1998-2000 and showed an increase between May-September and an important decrease from 2001. Out of the 659 cases of malaria, 599 (90.9%) cases were indigenous, 60 (9.1%) cases were imported and in all cases the determinant was *Plasmodium vivax*.

Conclusion: It is hoped that, with this study, the data will contribute to the epidemiology of malaria and its prevention in Bitlis.

(Türkiye Parazitol Derg 2012; 36: 1-3)

Key Words: Bitlis, malaria, epidemiology

Received: 05.12.2011

Accepted: 31.01.2012

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Fadile Yıldız Zeyrek, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye Tel: +90 532 224 11 93 E-posta: fadilezeyrek@hotmail.com
doi:10.5152/tpd.2012.01

GİRİŞ

Sıtma, tropik ve subtropik iklim kuşağındaki bölgelerde yaygın olarak görülen ve Plasmodium türü parazitlerin neden olduğu bir hastalıktır. İnsanda sıtma bir veya daha fazla Plasmodium türünün enfekte anopheles cinsi sivrisineklerin bulaşmasıyla olduğu gibi, kan transfüzyonu, doku transplantasyonu ve transplental yol ile de bulaşabilmektedir (1). Plasmodium'un çeşitli memelilerde enfekte eden yüzden fazla türü olmasına karşın, insanları enfekte eden yalnızca beş türü (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* ve *P. knowlesi*) bilinmektedir (2-5). Bu beş türden *P. vivax* dünyada en yaygın olan ikinci sıtma etkeni olarak bilinmektedir (3, 6, 7). Sıcak ilima sahip bölgelerde görülmeye başladığı sıtma, yurdumuzda değişik bölgelerde iklim koşullarına bağlı olarak farklı oranlarda görülmektedir (8-14). Ülkemizde sıtma tarama ve araştırma çalışmaları 1928 yılında başlamış, hastalık büyük ölçüde kontrol altına alınmış, ancak 1970 yılından sonra çeşitli nedenlerle yeniden bir artış olduğu görülmüştür (2).

Bu çalışmada Britis ilindeki son on bir yıllık dönemde saptanan sıtma vakalarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Retrospektif olarak planlanan bu çalışma, II Sağlık Müdürlüğü verileri incelenerek yapılmıştır. Britis II Sağlık Müdürlüğü Bulamcı Hastalıklar Şubesi'ne bağlı Sıtma kontrol birimi tarafından 1998-2008 yılları arasında yapılan aktif ve pasif sürveyans çalışmalarına toplam 86951 kişi sıtma yönünden incelenmiştir. Sıtma tarama, ateşi ve ateşsiz dönemlerde parmak uçlarından alınan kan örneklerinden kalın deri ve ince yayma kan preparatlarının Giemsa boyası ile boyanıp ışık mikroskopunda X1000 büyütme- de Plasmodium türleri araştırılarak konulmuştur. Sıtma saptanan olgular, cinayetleri, saptandığı aylar ve kaynaklarından bilgiler göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

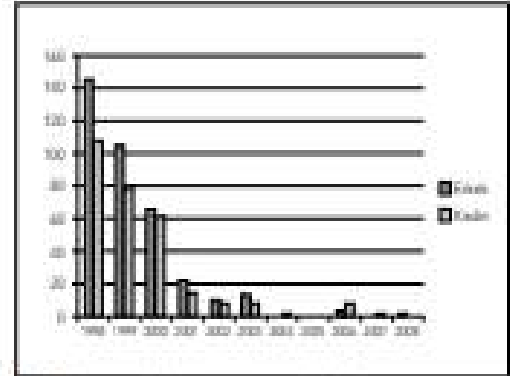
BULGULAR

On bir yıllık dönemde toplam 86951 kişiden kan örneği alınmış, 368'i (655.84) erkek, 2911 (644.16) kadın olmak üzere 659 kişide sıtma paraziti tespit edilmiştir. Yaşları 9 ile 60 arasında değişen olguların yaş ortalamaları 28.5 ve taramasında etkenin *P. vivax* olduğu belirlenmiştir. Pozitiflik oranı en yüksek 1998-2000 yılları arasında tespit edilmiş ve vakaların aylara göre dağılımı incelendiğinde en fazla Haziran-Eylül ayları arasında yoğunlaştığı ve

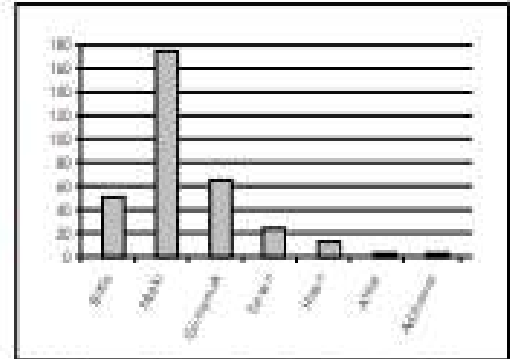
2001 yılından itibaren önemli bir düşüş gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 1). Olguların 599'unun (882.9) yeti, 60'un (90.1) diğer bölgelerden değişik sebeplerle Britis'e gelen kişilerin oluşturduğu belirlenmiştir. Şekil 2 ve 3'te sıtma olgularının cinayet ve yerleşim biçimine göre, Şekil 4'te ise yaş gruplarına göre dağılımı verilmiştir.

TARTIŞMA

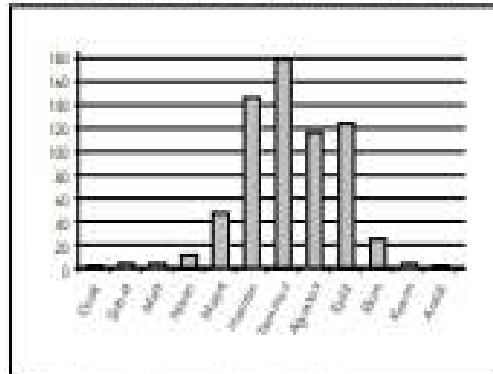
Dünya'da yaygın olarak görülen sıtma özellikle 5 yaş altı çocuklarda, gebelerde ve immüno-suprime kişilerde ağır seyredebilmektedir.



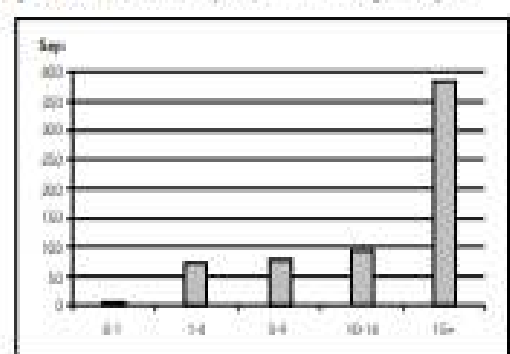
Şekil 2. Sıtma vakalarının cinayete göre dağılımı



Şekil 3. Sıtma vakalarının yerleşim biçimlerine göre dağılımı



Şekil 1. Sıtma vakalarının aylara göre dağılımı



Şekil 4. 1998-2008 yılları arasında sıtma vakalarının yaş gruplarına göre dağılımı

(15, 16). Ekonomik açıdan iş gücü kaybına neden olan sıtmanın ülkemizdeki durumu ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır (1, 11, 12, 15, 17, 18).

Bitlis ilindeki sıtmanın son durumunu gösteren bu çalışmamızda Türkiye ile paralel olarak ilimizde de 1998-2008 yılları arasında saptanan olgu sayısında düzenli bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir (5, 19).

Hastalık cinsiyet farkı göstermek için kadın veya erkek her iki cinsite de görülebilmektedir (20). Akkaya ve ark. (8) Şanlıurfa'daki olguların %52.7'sinin erkek olduğunu bildirmişlerdir. Taner (21) Kocaeli'deki olguların %70.3'ünün erkek olduğunu fakat bunun istatistiksel olarak önemli bulunmadığını belirtmiştir. Bu çalışmada sıtma olgularının 368'i (%55.84) erkek, 291'i (%44.16) kadındır (Şekil 2). Çalışmamızda cinsiyet dağılımında belirgin bir fark olmamakla beraber; erkeklerde fazla görülmesinin nedeni çalışma hayatında daha aktif olmaları ve sınırlarından aktif olduğu aşamaları dışında dış ortamda daha çok bulunmalarıyla açıklanabilmektedir (10).

Sıtma olgularının aylara göre dağılımı incelendiğinde olguların daha çok Haziran (%22), Temmuz (%27.01), Ağustos (%17.4) ve Eylül (%18.51) aylarında görüldüğü en az olguların ise Aralık-Ocak aylarında görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 1). Bu durumun sebebi yoğunluğunun daha çok bu aylarda artması ve bölge insanının bu dönemde açık havada uzun süre kalmamasından doğan bulaş riskinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızda saptanan tüm olguların etkeninin *P. vivax* olduğu tespit edilmiştir. Bu durum benzer çalışmalarıyla uyumlu bulunmuştur (8, 9, 12, 22, 23).

Sıtma olgularının merkez ve ilçelere göre dağılımı incelendiğinde vakaların %2'si (%7.69) Bitlis merkez ve merkeze bağlı köylerde, %4'u (%15.48) Mutki, %7'si (%10.17) Ürcüymak, %4'ü (%13.64) Tatvan ve %12'si (%1.82) Hizan ilçelerinde tespit edilmiştir (Şekil 3). Bitlis merkezde ve Tatvan'da tespit edilen olguların büyük bir kısmını Diyarbakır ve Batman'dan gelen göçmenler, mevsimlik işçiler, misafirler ve nakliyatçılar oluştururken, merkeze bağlı köylerde tespit edilen olguların tümünü yerli vakalar oluşturmaktadır. Merkeze bağlı bazı köylerde yüksek oranda sıtma görülmesinin nedeni geçmişte buralarda az da olsa çeltik tarımının yapıyor olmasından kaynaklanmaktadır. Mutki ilçesinde yüksek oranda sıtma görülmesinin nedeni ise burada bataklık alanlarının çok olması, eğitim düzeyinin diğer ilçelere oranla daha düşük olması ve bölgenin çok dağınık olmasından kaynaklanan ulaşımın güç olmasına bağlıdır.

Sıtma ülkemizde olduğu gibi ilimizde de bir halk sağlığı problemi olarak önemini korumaktadır. Ülkemizdeki sıtma karpı kullanılarak ilaçlara karşı direnç sorunun ortaya çıkması nedeniyle sıtma karpı alınan koruyucu önlemlerin endemik bölgelerde olduğu gibi ilimizde de kararlılıkla devam ettirilmesi gerekmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Akar O, Atıcı E, Töre O. Bursa ilinde 2006-2008 yılları arasında görülen sıtma olgularının değerlendirilmesi. Türkiye Parazitol Derg 2009; 33: 131-5.
2. Akkan MZ, Sönmez TG. Plasmodium türleri. Topcu AK, Söyletici G, Doğanay ME (ed.). Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2007; 2486-502.
3. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. Fourth Edition. Washington DC: ASM Press, 2001; 159.
4. Unat EK, Yılmaz A, Altay K, Sarıcan M. Unatın Tıp Parazitolojisi. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayın. İstanbul, 1995.
5. Zeyrek FY, Taşlıoğlu S, Yılmaz F, Doruk N, Palaçoğlu N, Arısoy N, et al. Limited polymorphism of the Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 gene in isolates from Turkey. Am J Trop Med Hyg 2010; 83: 1230-7. [CrossRef]
6. Donald JK. Plasmodium Species (Malaria). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed.). Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; 2817-21.
7. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. Sa-Form Ofset Ltd Şti Sivas, 2002; 71-86.
8. Akkaya F, Şimşek Z, Dilekç F, Bayrak Ş. Şanlıurfa ilinde sıtma epidemiyolojisi. Türkiye Parazitol Derg 2002; 26: 143-6.
9. Çetinliye Z, Çoçelik R. Afyon'da sıtma epidemiyolojisi. Türkiye Parazitol Derg 2004; 28: 77-9.
10. Erbuğ S, Günel M, Eyyüp M, Doğanay ES. Aydın yöresinde sıtma olguları. ADÜ Tıp Fak Derg 2002; 3: 5-8.
11. Saka G, Erten M, İçin E. Diyarbakır'da sıtma. Türkiye Parazitol Derg 2000; 24: 115-9.
12. Temiz H, Gül K. 1999-2004 yıllarında Diyarbakır'da saptanan sıtma olgularının değerlendirilmesi. Türkiye Parazitol Derg 2006; 30: 261-4.
13. Zeyrek FY, Kurcu MA, Zeyrek O, Şimşek Z. Parasite density and serum cytokine levels in Plasmodium vivax malaria in Turkey. Parasite Immunol 2006; 28: 201-7. [CrossRef]
14. Zeyrek FY, Balıoğlu A, Demirel S, Erdogan DD, Ak M, Korkmaz M, et al. Analysis of naturally acquired antibody responses to the 19-kD C-terminal region of merozoite surface protein-1 of Plasmodium vivax from individuals in Şanlıurfa, Turkey. Am J Trop Med Hyg 2008; 78: 329-32.
15. Canda MŞ. Sıtmanın ekopatolojisi ve ülkemiz için önemi. Türkiye Parazitol Derg 1991; 15: 1-12.
16. Rogers WO. Plasmodium and Babesia. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoen JH, Tenen RH, eds. Manual of Clinical Microbiology, 8th Ed. Washington DC: ASM Press, 2003; 1944-59.
17. Altay K, Polat E, Akın NE, Özcan N, Sevimli AA. 1993-1997 yılları arasında İstanbul ilinde sıtma birimince belirlenen sıtma olguları. Türkiye Parazitol Derg 1998; 22: 44-8.
18. Kık S, Özden M, Kaplan M. Elazığ'da 1996-2004 yılları arasında sıtma epidemiyolojisi. Türkiye Parazitol Derg 2004; 28: 265-7.
19. Türkiye Cumhuriyeti, Sağlık Bakanlığı, Sıtma Savaş Öncesi Bakanlığı verileri, 2005.
20. Akdur R. Sıtmanın epidemiyolojisi. Özcel MA. (Ed.). Sıtma, Malaria. Türkiye Parazitol Derg 2004; 28: 135-7.
21. Taner GS. Kocaeli'de sıtma epidemiyolojisi. Türkiye Parazitol Derg 2008; 32: 213-6.
22. Göz Y, Kuroğlu MG, Gürsoy M, Aydın A. Van ilinde sıtma epidemiyolojisi bir çalışma. Türkiye Parazitol Derg 2004; 28: 135-7.
23. San C, Sekaya S, Ersoy H, Öncü S, Erbuğ S. Aydın ilinde 2001-2003 yılları arasında saptanan sıtma olgularının değerlendirilmesi. Türkiye Parazitol Derg 2004; 28: 119-22.